

**Aus der Kinderklinik im Dr. v. Hauner'schen Kinderspital
der Universität München**

Direktor: Professor Dr. A. Wiskott

Über die quantitative Bestimmung mit Hilfe verschiedener Modifikationen der Zimmermann'schen Farbreaktion und die papierchromatographische Auftrennung von Cortison, Hydrocortison und Prednison nach oxydativer Überführung in C-17-Ketosteroide

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Herbert Stolecke
aus Wuppertal-Vohwinkel

1958

Aus der Kinderklinik im Dr. v. Hauner'schen Kinderspital der Universität München

Direktor: Professor Dr. A. Wiskott

Über die quantitative Bestimmung mit Hilfe verschiedener Modifikationen der Zimmermann'schen Farbreaktion und die papierchromatographische Auftrennung von Cortison, Hydrocortison und Prednison nach oxydativer Überführung in C-17-Ketosteroide

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von



Herbert Stolecke

aus Wuppertal-Vohwinkel

1958

In der Bibliothek der Dr. v. Sauer'schen Verlagsbuchhandlung
der Universität München
Bayerische Staatsbibliothek in München

Die vorliegende Dissertation ist eine Arbeit des
Herrn Dr. A. Wiskott, geboren am 1. April 1908 in
München, welche er zur Erlangung des
Gradus eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität München
eingereicht hat.

INHALTS-VERZEICHNIS

Die vorliegende Dissertation ist eine Arbeit des
Herrn Dr. A. Wiskott, geboren am 1. April 1908 in
München, welche er zur Erlangung des
Gradus eines Doktors der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität München
eingereicht hat.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. A. Wiskott

Dekan: Professor Dr. K. Kolle

Tag der mündlichen Prüfung: 18. 12. 1958

Die zentrale Rolle, die die Nebennierenrinde im intermediären Stoffwechsel einnimmt, machte die Entwicklung von Methoden zur Kontrolle ihres Funktionszustandes notwendig. Voraussetzung dafür war zunächst einmal die Aufdeckung der Struktur der biologisch aktiven Substanzen. Die Nebennierenrinde produziert Corticosteroide, die ein typisches 21-C-Atomskelett besitzen, weiterhin 19-C-Körper, die sogenannten Androgene, und wahrscheinlich auch Östrogene mit einer 18-C-Konfiguration. Die klinisch interessanteste Hormongruppe stellen die Corticosteroide dar, die in den Kohlehydrat-, Eiweiß- und Mineralstoffwechsel eingreifen. Sie haben im Gegensatz zu den 19-C-Körpern keine androgene Wirkung.

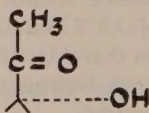
Bei der bisher geübten Bestimmung der 17-Ketosteroide (17KS) im menschlichen Urin wurden bekanntlich nur 19-C-Steroide erfaßt. Diese stammen überwiegend von androgenen Hormonen, die in den Testes und der Nebennierenrinde produziert werden, ab, und nur zu einem geringen Teil kommt in dieser Fraktion auch die Sekretion von 21-C-Steroiden zum Ausdruck, da diese Hormone in der Regel als inaktive 21-C-Hormonmetaboliten im Harn erscheinen. Der Vorteil der 17KS-Bestimmung wiederum liegt in ihrer relativen Einfachheit und in der Möglichkeit, die weitgehend stabilen 17KS von der im Harn fast stets vorhandenen Bindung an Säuren durch einfache Hydrolysemanipulationen zu befreien.

BROOKS und NORBYNBERSKI machten nun den Vorschlag, die sehr labilen 21-C-Steroide des Urins durch Oxydation in 17KS zu überführen und dann, nach der üblichen Hydrolyse, ein zweites Mal die 17KS-Fraktion zu bestimmen. Zur Oxydation wurde zunächst die Perjodsäure herangezogen, wie sie zur analytischen Bestimmung der „formaldehydogenic and acetaldehydogenic steroids“ Anwendung fand. So konnte eine Reihe von Corticosteroiden in 17KS umgewandelt werden. HEIDT, GLADDING und PURVES fanden im Natriumwismutat (NaBiO_3) ein Oxydationsmittel, das in Spezifität und Ausmaß der Reaktion weitgehend der Perjodsäure gleicht und darüberhinaus den physikalischen Vorteil der Unlöslichkeit im gewählten 50%igen Eisessigmilieu hat. Weiter fand sich, daß NaBiO_3 im Gegensatz zur Perjodsäure α -Hydroxysäuren trennt. Diese Tatsache benutzten nun wieder BROOKS und NORBYNBERSKI, um eine bedeutende Gruppe von Corticosteroiden zu charakterisieren, die eine Dihydroxy-azeton-Seitenkette tragen. Mit Hilfe des Natriumwismutates konnten diese Corticosteroide in 17KS überführt werden.

Diese Methode der Bestimmung der sogenannten „17-ketogenen Corticosteroide“ (17KGS) hat gegenüber der bisherigen Corticoidbestimmung eine Reihe von Vorteilen. Zunächst wird eine weitaus größere Anzahl von Corticosteroiden der chemischen Bestimmung erschlossen, weiterhin ist es denkbar, daß nicht nur z. B. Cortison und Cortisonabbauprodukte erfaßt werden, sondern auch Vorstufen mit veränderter Seitenkette, eventuell auch solche pathologischer Natur. Ein weiterer Vorteil dieser Methode liegt in der

Möglichkeit, die Hydrolyseschwierigkeiten zu umgehen, insofern, als die Wismutatoxydation die Corticoide in situ, d. h. innerhalb ihrer Bindung an Glukuron- oder Schwefelsäure zu 17KS oxydiert, welche ja weit weniger gegen eine Hydrolyse mit starker Säure empfindlich sind. Darüberhinaus gewährt sie die Beibehaltung der gebräuchlichen und als solche bewährten Farbreaktion nach ZIMMERMANN, die, wenngleich verschieden modifiziert, allgemeine Verbreitung gefunden hat. Das Umgehen der weitaus komplizierteren, direkten Corticosteroidbestimmung und die gleichzeitige Erfassung von 3-4 Seitenkettentypen lassen die 17KGS-Bestimmung für klinische Zwecke sehr geeignet erscheinen.

Zum Beweis der Brauchbarkeit ihrer Methode haben BROOKS und NORBYMERSKI meist die leichter zugänglichen, aktiven Hormone als Eichsubstanzen dem Arbeitsgang unterworfen, obwohl ja diese Hormone im menschlichen Harn kaum ausgeschieden werden. Die Autoren haben im Gegensatz zu den an der hiesigen Klinik durchgeführten Versuche dabei eine beinahe vollständige Wiederauffindung der verwendeten Hormone berichtet. In ihrer 1953 erschienenen Arbeit „Assesment of adrenocortical activity by assay of 17-ketogenic steroids in urine“ berichten NORBYMERSKI, STUBBS und WEST über Corticoidextraktionen aus dem Harn, u. a. auch über Versuche, einer Harnprobe z. B. Cortison zuzusetzen und dem üblichen Arbeitsgang zu unterwerfen. Derartige Versuche sind bisher jedoch nur gelegentlich durchgeführt worden. Cortison und Hydrocortison wurden in vitro Urinproben zugesetzt, desgleichen Untersuchungen mit Urinproben Cortison-behandelter Patienten vorgenommen. Dabei wurde lediglich die kolorimetrische Bestimmung nach CALLOW angewandt. Etwas später haben dann APPLEBY, GIBSON, NORBYMERSKI und STUBBS die Methode zur Bestimmung der 17KGS durch vorheriges Versetzen des des Reaktionsgemisches mit Natriumborhydrid (NaBH_4) modifiziert, erstens, um die doppelte 17KS-Bestimmung zu vermeiden, denn die primär vorhandenen 17KS werden zu Alkoholen reduziert, zweitens, um Steroide mit der Konfiguration



an C 17 mit zu erfassen. Das wirksame Prinzip der Reaktion besteht darin, daß sämtliche Ketogruppen, also nicht nur die der Seitenkette, zu Alkoholgruppen reduziert und dadurch manche erst nicht wismutatoxydablen Steroide oxydierbar werden. Andererseits entstehen aber durch die Behandlung mit NaBH_4 andere Ketosteroidoide.

In der hier vorliegenden Arbeit, die sich mit den z.Zt. therapeutisch gebräuchlichsten Hormonen Cortison, Hydrocortison und Prednison befaßt, wird versucht, über folgende Fragestellungen Aufschluß zu erhalten:

- I) Wie verhalten sich Cortison, Hydrocortison und Prednison in wässriger Lösung nach Wismutatoxydation hinsichtlich ihrer kolorimetrischen Bestimmbarkeit unter Verwendung der drei bekannten Modifikationen der Zimmermann'schen Farbreaktion und wie können die kolorimetrisch gefundenen, quantitativen Werte mit Hilfe der papierchromatographischen Auftrennung der Spaltprodukte erklärt werden?
- II) Wieweit kann das in vitro einem Urin zugesetzte Hormon kolorimetrisch und papierchromatographisch nachgewiesen werden?
- III) Wie kommt der Einfluß der Reduktion der hier diskutierten Hormone mit NaBH_4 kolorimetrisch und mit Hilfe der Papierchromatographie zum Ausdruck?
- IV) Es muß weiterhin geklärt werden, ob die eingreifende Hydrolyse in Form des Kochens mit konzentrierter Salzsäure wie bei den üblichen Ketosteroiden nicht doch eine Beeinträchtigung darstellt, und ob die milde, mit der Oxydation in 50%iger Essigsäure bereits erfolgende Hydrolyse genügt.

Die von mir durchgeführten Versuche basieren, was ihre Methodik angeht, im wesentlichen auf den Arbeiten von BROOKS und NORBYN und denen von DICZFALUSY und Mitarbeiter. Erstere benutzten für ihre theoretischen Versuche Benzol als Extraktionsmittel und schüttelten bei Versuchen mit Urinen mit Äthylendichlorid aus. DICZFALUSY und Mitarbeiter konnten indessen zeigen, daß bei Verwendung von Äther als Extraktionsmittel höhere Normalwerte bei Urinproben erreicht werden können. Daher wird an der hiesigen Klinik mit Äther ausgeschüttelt. Eine Änderung jedoch erfuhr die Wahl der Ausgangsmenge der zu bearbeitenden Hormonlösungen oder Urinproben insofern, als der gewonnene Extrakt für drei Kolorimetriearten ausreichen und zudem noch ein Rest zur papierchromatographischen Trennung der Spaltprodukte übrig bleiben sollte. So wurden zwischen 25 und 50 ccm als Ausgangsmenge angesetzt. Der chronologische Ablauf des Arbeitsganges, nach dem die hier vorgelegten Ergebnisse gefunden wurden, soll nun im einzelnen dargestellt werden.

I. Herstellung der Ausgangslösungen

- a) Von Cortison, Hydrocortison und Prednison wurde jeweils eine 100mg%/ige Lösung hergestellt, als Lösungsmittel wurde Azeton p. a. gewählt. Von diesen Lösungen wurden 5 ccm in einen Erlenmeyerkolben einpipettiert und in einem Thermostaten bei 37° auskristallisiert. Die endgültige Lösung erfolgte dann unter Zugabe von je 20,0 ccm aqua bidest. und Eisessig, sodaß praktisch vor jeglicher Ma-

nipulation eine 25mg⁰/eige, wässrige Hormonlösung vorlag.

(Die Zugabe von Eisessig, die ja schon in den Bereich der Oxydation gehört, wurde hier nur zur Erklärung der Auflösung des kristallinen Hormons erwähnt, das bekanntlich wasserunlöslich ist.)

- b) Sollten die Hormone als Zusatz zum Urin verwendet werden, so wurde die zum Zusetzen beabsichtigte Menge einer 25mg⁰/eigen Lösung des Hormons entnommen, in einen Erlenmeyerkolben einpipettiert und auskristallisiert. Die Lösung erfolgte in Analogie zu dem oben Gesagten in Urin und Eisessig.
- c) Wurde eine native Urinprobe als Ausgangslösung benötigt, so wurde diese einem 24-Stunden-Harn entnommen, vorbereitende Arbeiten waren nicht erforderlich.
- d) Zur Hydrierung wurden bei Urinen zu den Ausgangsmengen 500-800 mg NaBH₄ zugegeben und die Lösung 12 Stunden im Dunklen belassen.
- e) Zur Hydrierung von Hormonen kam deren vorherige Lösung in 50⁰/eigem Eisessig im Sinne des Abschnittes a) nicht in Frage, da der Eisessig das NaBH₄ aufbraucht und durch Überführen in Alkohol unwirksam macht. Deshalb mußte hier eine Lösung von Cortison und Hydrocortison in Alkohol abs. und von Prednison in Azeton verdünnt werden. (Prednison erwies sich als alkoholunlöslich). Dazu wurden für jeden Ansatz 25 mg des betreffenden Hormons in einer so gering wie möglich gehaltenen Menge des jeweiligen Lösungsmittels gelöst. Anschließend konnte mit aqua bidest. auf 100 ccm, also zu einer 25 mg⁰/eigen Lösung aufgefüllt werden. Nun wurden 400-500 mg NaBH₄ zugegeben und das Reaktionsgemisch 12 Stunden im Dunklen belassen. Hormonlösungen, die nach Abschnitt a) und nach der hier geschilderten Methode hergestellt wurden, zeigten in Parallelversuchen keine meßbaren Unterschiede.

II. Oxydation und Hydrolyse

Entsprechend einer Ausgangslösung von 20,0 ccm bei Hormonen und 25,0—30,0—50,0 ccm bei Urinen wurde die gleiche Menge Eisessig zugegeben. Nach Versetzen mit NaBiO₃, 5,0 g auf 20,0 ccm Hormonlösung und 7,0 g auf 25,0 ccm Urin, wurde das Reaktionsgemisch eine Stunde bei Dunkelheit geschüttelt und danach 12 Stunden ebenfalls im Dunklen belassen. Zur Weiterverarbeitung werden nun das Reaktionsgemisch von dem überschüssigen NaBiO₃ durch Abgießen und Zentrifugieren befreit und von der so erhaltenen klaren Flüssigkeit 25,0 ccm in Hydrolysegläser abpipettiert. Es werden nun hinzugefügt a) die gleiche Menge aqua bidest., b) 1,5 ccm einer 3⁰/eigen NaHSO₃-Lösung, um die Oxydation vollends abzustoppen, c) 5,0 ccm konzentrierte HCl zur Kochhydrolyse.

Da die Ansätze bis hierher doppelt durchgeführt worden sind, kann nun jeweils ein Ansatz derselben Ausgangslösung hydrolysiert werden, also 15 Minuten in ein Wasserbad von 100° gestellt werden, der entsprechende Parallelansatz, dem natürlich keine HCl zugegeben wurde, wird in der vorliegenden Form weiterverarbeitet.

III. Gewinnung des sog. Trockenextraktes

Die hydrolysierten wie die nicht hydrolysierten Ansätze werden in Scheidetrichtern zweimal mit je 30,0 ccm Äther p. a. für 25,0 ccm Zentrifugat nach der Oxydation ausgeschüttelt. Wenn, entsprechend größeren Ausgangsmengen, mehr als 25,0 ccm Zentrifugat gewonnen wurden, muß die Äthermenge in gleichem Verhältnis vergrößert werden. Die hierdurch erhaltenen Ätherextrakte werden zusammengegeben, zweimal mit 10%iger KOH gereinigt sowie dreimal mit aqua dest. nachgewaschen. Nach Ablassen der dritten wässrigen Phase wird der Ätherextrakt in einem Becherglas aufgefangen und in einen Vakuumtopf gestellt, wodurch der Äther abdampft und der „Hormontrockenextrakt“ der betreffenden Ausgangslösung zurückbleibt. In einigen Versuchen wurde in Anlehnung an N O R Y M B E R S K I und Mitarbeiter Benzol als Extraktionsmittel verwendet, Änderungen in der Extraktions- und Reinigungsmethode wurden nicht vorgenommen.

SCHILD hat 1954 einen anderen Vorschlag zur Weiterverarbeitung des Oxydationsgemisches gemacht. Er ging von der Theorie aus, daß möglicherweise ein Teil der Steroide praktisch an dem überschüssigen NaBiO₃ haften bliebe und empfahl daher die Auflösung des gesamten NaBiO₃-Überschusses mit konzentrierter Salzsäure.

Zur genaueren Betrachtung ist von mir eine kleine Versuchsreihe von 8 Parallelversuchen mit Urinen durchgeführt worden, wobei die ersten acht Proben nach der Schild'schen Methode, die parallel dazu angesetzten in der üblichen Weise verarbeitet wurden. Die numerische Auswertung ließ indessen keine Unterschiede zwischen je zwei parallelen Ansätzen erkennen, die außerhalb der experimentellen Schwankungsbreite lagen. Damit ist die Schild'sche Vermutung, daß im Bodensatz des abzentrifugierten Oxydationsgemisches Steroide zurückbleiben, zwar nicht widerlegt, es ist aber als sicher anzunehmen, daß evtl. zurückbleibende Steroide keine zahlenmäßig bedeutsame Rolle spielen. Andererseits besteht jedoch die Gefahr, daß bei Verwendung der Schild'schen Methode empfindliche Steroide durch die Salzsäure zerstört werden, daher ist von uns die unter II beschriebene Methode der Weiterverarbeitung bevorzugt worden.

— — —

Die numerische Erfassung des Steroidgehaltes eines Extraktes erfolgte, wie oben erwähnt, unter Verwendung der Farbreaktion nach ZIMMERMANN mit m-Dinitrobenzol in alkalischem Milieu. Wenngleich diese Farbreaktion die Grundlage für jede kolorimetrische Bestimmung darstellt, so sind doch die Bestimmungsmethoden nicht einheitlich. ZIMMERMANN selbst beschrieb zwei Modifikationen seiner Farbreaktion. Bei der ersten wird die in einem zu 33 $\frac{1}{3}$ % wässrigen Milieu entstehende Farbe in zwei Wellenbereichen abgelesen, da außer der hellroten Hormonfarbe mit einem Absorptionsmaximum bei 530m μ besonders bei Urinextrakten auch eine mehr bräunliche Störfarbe mit einem Absorptionsmaximum bei 420m μ entsteht. Unter Anwendung der Vierordt'schen Gleichung kann so eine Korrektur vorgenommen werden. Dies hat allerdings zur Voraussetzung, daß sich die Absorptionskurven in den gewählten Bereichen möglichst verschieden verhalten und sich die Einzelfarben addieren. Dies ist für Gemische von Androsteron/Testosteron und Androsteron/Kreatinin nachgewiesen worden (ZIMMERMANN, ANTON, PONTIUS). Dabei galten Testosteron bzw. Kreatinin als Modellssubstanzen für das an sich störende Chromogen. Unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktionskonstanten für Androsteron und Testosteron ergibt sich folgende Korrektionsformel:

$$e_{\text{grün}} \cdot A - e_{\text{violett}} \cdot B = \text{mg\% Androsteron-Äquivalente}$$

Die Extinktionskonstanten A und B hat ZIMMERMANN für Androsteron mit 52 bzw. 28 angegeben. Bei der Nachprüfung dieser Formel mit alkoholischen Hormonlösungen zeigte sich in der hiesigen Klinik, daß bei Verwendung von Dehydroisoandrosteron (DHA) diese Faktoren gut brauchbar waren, während sich für Androsteron stärkere Abweichungen ergaben. Damit konnte die Zimmermann'sche Formel ohne Änderung verwendet werden. Die numerischen Ergebnisse sind also in %DHA-Äquivalenten zu verstehen. Die zweite Modifikation von ZIMMERMANN, die ebenso, wie die eben beschriebene, in Deutschland bevorzugt benutzt wird, beruht auf der Theorie, daß die reine Hormonfarbe mit Chloroform ausgeschüttelt werden kann, während die Störchromogene in der KOH/Wasser/Alkohol-Phase zurückbleiben. Die Hormonfarbe soll dann bei 490m μ abgelesen werden. CALLOW beschrieb eine andere Modifikation, die vornehmlich in den anglo-amerikanischen Ländern eingebürgert ist und die sich von den Zimmermann'schen Kolorimetriearten grundlegend dadurch unterscheidet, daß bei ihr das streng absolut alkoholische Milieu vorherrscht und die gelbbraune Störfarbe der Zimmermann'schen Modifikationen weit geringere Intensität aufweist. Auch hier wird bei 530m μ und 420m μ abgelesen und rechnerisch korrigiert. Die dazu von dem Autor angegebene Korrektionsformel heißt:

$$\frac{e_{\text{grün}} \cdot 1,5 - e_{\text{violett}}}{1,1} = \text{mg/0,2 ccm} \quad (\text{alkoholischen Extraktes in DHA-Äquivalenten})$$

In der vorliegenden Arbeit werden nun die drei Modifikationen der Zimmermann'schen Farbreaktion durchgeführt, da die Ergebnisse, die an der hiesigen Klinik besonders bei Harnextrakten gefunden wurden, zeigten, daß unter Zugrundelegung desselben Extraktes z. T. ganz erhebliche Differenzen zu Tage traten, die ihrerseits nicht verhältnismäßig oder sonstwie konstant waren.

Die technische Durchführung der Anwendung der drei Kolorimetriearten soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

I) Modifikation nach C A L L O W

Der nach Abdampfen des Äthers entstandene Trockenextrakt wird bei Urin- und Hormonzusatzextrakten in 2,0 ccm, bei höher konzentrierten Hormonextrakten in 5,0 ccm absolutem Alkohol aufgelöst. (Alkoholische Extraktlösung). Es wird dann für jeden Extrakt gesondert — es werden in der Klinik meist 8 Extrakte in einem Arbeitsgang verarbeitet — folgendes Reaktionsgemisch hergestellt:

0,2 ccm der alkoholischen Extraktlösung

0,2 ccm einer alkoholischen 3n-KOH

0,2 ccm m-Dinitrobenzol 2⁰/10g/Alkohol

Es wird dazu ein Reagentienleerwert erstellt, um die durch Reagentien bedingte Farbe zu eliminieren:

0,2 ccm Alkohol abs.

0,2 ccm einer alkoholischen 3n-KOH

0,2 ccm m-Dinitrobenzol 2⁰/10g/Alkohol (DNB)

Da die Reaktion nach Zugabe von DNB sofort einsetzt, wird diese Substanz erst zugegeben, wenn alle Proben vorbereitet sind und dann sofort in ein Wasserbad von 25,0⁰ C gebracht werden können, in dem sie eine Stunde unter Ausschluß des Lichtes belassen werden. In der Klinik wird zu diesem Zweck ein Hoepner-Thermostat $\pm 0,1^0$ C benutzt.

Die Reaktionszeit dieser Ansätze nach C A L L O W wird zur Vorbereitung der beiden Zimmermann'schen Modifikationen ausgenutzt, sodaß die Ansätze zur ersten Zimmermann'schen Ausführung etwa nach einer halben Stunde in das Wasserbad gestellt werden und die der zweiten nach 60 Minuten gegen die Callow-Ansätze ausgetauscht werden können. Diese Zeiteinteilung erwies sich als notwendig und sinnvoll, weil einmal die Aufnahmefähigkeit des Thermostaten begrenzt und zum anderen so eine wirtschaftliche Zeitausnutzung gegeben war, denn die verbleibenden Intervalle nach der ersten Stunde können mit Messung der Farbe und anderen Arbeiten ausreichend ausgefüllt werden.

Die kolorimetrische Ablesung der Callow-Ansätze geschieht nach Verdünnung des Reaktionsgemisches mit 10,0 ccm absolutem Alkohol wie dargelegt in den Wellenbereichen 530m μ und 420m μ . Sämtliche Proben werden gegen Alkohol abgelesen und der Reagentienleerwert subtrahiert. Unter

Benutzung der vom Autor angegebenen Farbkorrektionsformel wird die korrigierte Extinktion berechnet und auf einer für diese Modifikation hergestellten Eichkurve mit DHA die mg/0,2 ccm der alkoholischen Extraktlösung abgelesen. Durch Multiplikation mit den jeweils in Frage kommenden Faktoren können dann die mg⁰%, mg/L und mg/die festgestellt werden.

II) Modifikation nach ZIMMERMANN mit Ablesen der Extinktionen in zwei Wellenbereichen

Der zur Ausführung der Modifikation I in 2,0 ccm (bzw. 5,0 ccm) aufgelöste Trockenextrakt wird nun mit absolutem Alkohol auf 10,0 ccm (bzw. 20,0 ccm) Gesamtmenge aufgefüllt. Dann wird für jeden Extrakt folgendes Reaktionsgemisch angesetzt:

- 1,5 ccm der alkoholischen Extraktlösung
- 1,5 ccm einer wässrigen 3n-KOH
- 1,5 ccm m-DNB/Alkohol

Außer dem Reagentienleerwert, der bei Verwendung von jeweils 1,5 ccm analog zu dem in Modifikation I hergestellt wird, laufen bei dieser Methode noch sog. Extraktleerwerte mit, in die statt des DNB 1,5 ccm absoluter Alkohol einpipettiert werden. Damit wird die Eigenfarbe des Gemisches Extrakt/KOH/Alkohol berücksichtigt. Die kolorimetrische Ablesung des Hauptversuches (Extrakt/KOH/DNB) erfolgt nämlich gegen diese Extraktleerwerte. Die Subtraktion der Reagentienleerwerte ergibt dann die Extinktionen, die in die Korrektionsformel eingesetzt werden müssen. Der Reagentienleerwert selbst wird gegen Alkohol abgelesen.

Die Formel gibt den Gehalt der alkoholischen Extraktlösung in mg⁰% DHA-Äquivalenten wieder, wobei zur endgültigen Berechnung die Konzentration des alkoholischen Extraktes in Bezug auf die extrahierte, wässrige Hormonlösung berücksichtigt werden muß. Weiterhin muß die Entnahme zur Ausführung der Modifikation I korrigiert werden: Faktor $0,9$ bzw. $0,9/10$. Der dritte Faktor richtet sich nach der Menge des Zentrifugates nach Oxydation.

Beispiel:

Nach Auffüllung eines Extraktes auf insgesamt 10,0 ccm nach Ausführung der Callow-Modifikation wurden gemessen:

Extinktion bei 530m μ : 0,210

Extinktion bei 420m μ : 0,185

In die Formel eingesetzt ergibt sich:

$$0,210 \times 52 - 8,185 \times 28 = \text{mg}^0\% \text{ der alkoholischen Extraktlösung}$$

$$10,95 - 5,17 = 5,78$$

Da der Extrakt aus einer z. B. 25mg⁰%igen Lösung hier nur in 10,0 ccm gelöst wurde, liegt er also in 10facher Konzentration vor, d. h. der Formelwert (FW) muß durch 10 dividiert werden. Dazu kommt der Faktor 10/9 (Korrektur Mod. I). Entsprechend 25,0 ccm Ausgangslösung und einer 1:1-Verdünnung mit Eisessig sind bei einer Entnahme von 25,0 ccm Zentrifugat 12,5 ccm Ausgangslösung extrahiert worden, auf 100 bezogen ergibt

sich der dritte Faktor 8. Somit heißt der Korrekptionsquotient:

$$\frac{5,78 \times 10 \times 8}{10 \times 9} = 5,13 \text{ mg}\% \text{ DHA-Äquival.}$$

III) Modifikation nach ZIMMERMANN unter Verwendung der Chloroformausschüttelung

Bei dieser Ausführung werden von Extrakt und Reagentien jeweils 2,0 ccm einpipettiert, sonst wird sie zunächst genau so ausgeführt, wie Modifikation II. Nach der einstündigen Reaktionszeit im Wasserbad werden alle Proben mit 8,0 ccm CHCl_3 versetzt und geschüttelt. Die wässrig/alkoholische Phase trennt sich von der CHCl_3 -Phase, die sich unten absetzt. Mit einer mit dem Finger verschlossenen Pipette geht man durch die Wasser/Alkohol-Phase durch und entnimmt der CHCl_3 -Phase einige ccm zur Kolorimetrie. Diese CHCl_3 -Menge, die also den Hormon- bzw. Steroidfarbstoff enthält, wird vor der kolorimetrischen Messung durch ein Filter mit wasserfreiem Natriumsulfat geschickt. Der Reagentienleerwert wird gegen CHCl_3 abgelesen, die Ablesung der anderen Proben erfolgt wie bei Modifikation II, als Filter wird S 49 ($490\text{m}\mu$) benutzt.

Es ist noch wichtig, darauf hinzuweisen, daß zur Kontrolle der technischen Durchführung jeder Kolorimetrie stets bei allen Modifikationen ein Ansatz mit Dehydroisoandrosteron — DHA — mitlief. Auf diese Weise konnten auch die Eichkurven dauernd kontrolliert werden. Für Modifikation I wurde eine 20%ige, für Modifikation II und III eine 10%ige DHA-Lösung gewählt.

— — —

Die **papierchromatographische Auftrennung** der einzelnen Oxydationsprodukte hat zum Ziel, Teile eines Hormongemisches möglichst mit bekannten Eichsubstanzen zu identifizieren, womit in unserem Fall die Oxydationsvorgänge genauer zu studieren sind. Es können dabei unter Berücksichtigung der Oxydationsprodukte und ihrer Farbäquivalente u. U. Rückschlüsse auf die kolorimetrischen Ergebnisse gezogen werden, die ja nur die Summe aller jeweils auftretenden, chromogenen Substanzen widerspiegeln. Zu diesem Zweck wurde ein System benötigt, das klinisch einfach und routinemäßig durchzuführen ist und das die am häufigsten auftretenden 11-oxy- von den 11-desoxy-Verbindungen unterscheiden läßt.

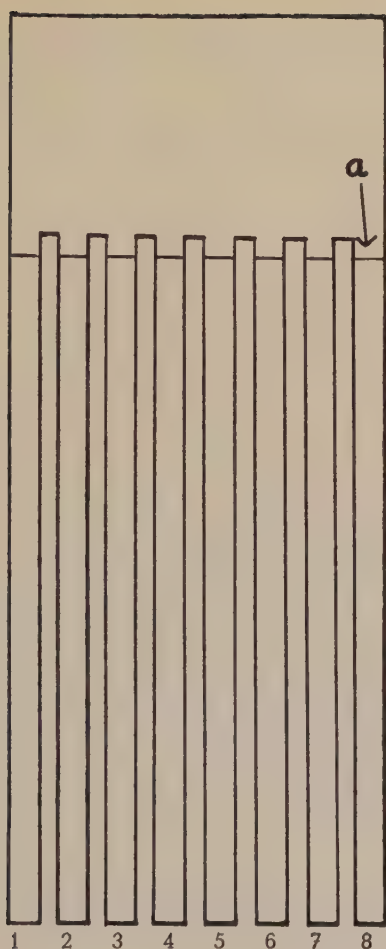
An der hiesigen Klinik ist das System „B3“ nach BUSH, allerdings unter Berücksichtigung örtlicher und technischer Gegebenheiten mit einigen Änderungen eingeführt worden. Einmal wurde auf die Einhaltung einer gleichbleibenden Temperatur von $38,0^\circ \text{C}$ auf Grund der vorliegenden Laboratoriumsverhältnisse verzichtet, zum anderen ebenso auf Druck- und Feuchtigkeitskonstanz, Faktoren, die für die Papierchromatographie (PCG) einen eigenen Raum beanspruchen, der nicht zur Verfügung stand. Aus diesen Gründen liefen bei jeder einzelnen Trennung Eichsubstanzen mit, um eventuelle

Eichwertschwankungen zu erkennen und zu berücksichtigen. Der Laufwert von Androsteron wurde gleich 1,00 gesetzt und relativ dazu der Laufwert der anderen Substanzen bestimmt.

Einige Worte sollen noch kurz das Wesen des Systems nach BUSH erklären. Die anfänglichen Schwierigkeiten bei der papierchromatographischen Trennung von Steroiden auf Grund der fettlöslichen Eigenschaften dieser Substanzen konnten durch vorheriges Imprägnieren des Papiers beseitigt werden (BURTON, ZAFFARONI u. Mitarbeiter). Es war also ein Lösungsmittelsystem mit einer „stationären“ und einer „mobilen“ Phase notwendig geworden. Das Neue an der Bush'schen Methode ist nun, daß der Autor von der bisher geübten Imprägnation des Papiers durch Tränkung Abstand nahm und das zur Trennung vorgesehene Papier in einen luftdicht verschlossenen und abgedunkelten Kasten hängte, in dem ein Sättigungsdampf des Lösungsmittelsystems herrschte. Dies besteht hier aus Benzin, Benzol, Methanol und aqua bidest. im Verhältnis 67:33:80:20 und wird durch Schütteln gegenseitig abgesättigt. Die sich nach Trennung oben befindliche Phase wird, nachdem das Papier 12 Stunden im Kasten vorbereitet worden ist, als mobile Phase in einen Trog gebracht, an dem das Papier hängt und in den es eintaucht. Damit beginnt dann die absteigende papierchromatographische Auftrennung.

Die technische Ausführung ist verhältnismäßig einfach. Auf vorgeschnittenen Kammstreifen eines saugfähigen Papiers (in Anlehnung an das Muster von NEHER und v. ARX, CIBA-Basel) werden unter Bezug auf die kolorimetrischen Werte nach Modifikation I zwischen 60 und 300 γ der zu trennenden Substanz aufgetragen. Sie werden dem nach Ausführung der drei kolorimetrischen Modifikationen in Zentrifugengläser überführten Rest des Extraktes entnommen, der nach Verdampfen des Alkohols in Methanol-Azeton 1:1 aufgelöst wird, da dieses Medium schneller verdampft und sich damit zum Auftragen besser eignet. Mit Mikropipetten wird die gewählte Menge möglichst punktförmig auf einen Streifen bei a (siehe Abb.) aufgetragen. Die beiden äußeren und der vierte Streifen werden mit Eichsubstanz beschickt.

Ein mit der Front des Trennungsmittels laufender Farbstoff wird ebenfalls auf die Eichstreifen aufgetragen, um die Lösungsmittelfront dauernd und besser beobachten zu können. Die so beschickten Streifen werden, wie beschrieben, für 12 Stunden in den Kasten gehängt und dann die Auftrennung in Gang gesetzt. Wenn die Markierungsfarbe das Ende der Streifen erreicht hat, werden sie herausgenommen, getrocknet und gefärbt. Die Färbetechnik bestand zunächst in einem abwechselnden Besprühen der Streifen mit alkoholischer KOH und 1%iger, alkoholischer DNB-Lösung, später wurde der Technik des Durchziehens der Streifen durch eine KOH/DNB-Lösung mit nachfolgendem Abtrocknen der Vorzug gegeben. Die Streifen werden dann unter infrarotem Licht getrocknet, wobei die getrennten Oxydationsprodukte,



d. s. also 17KS, in violetter Farbe sichtbar werden. Anhand von Eichlösungen, von denen jeweils eine bekannte Menge aufgetragen wird, kann die Farbin-
tensität der einzelnen Fraktionen annähernd und mit ausreichender Genauig-
keit geschätzt werden. Zur weiteren Differenzierung kann man vorher die
ungefärbten Streifen mit ultravioletttem Licht ($250\text{m}\mu$) photographieren,
wobei sich die konjugierte Doppelbindung im Anschluß an C3 in einer Ab-
sorption bemerkbar macht.

Ergänzend sollen hier noch die bei der PCG verwendeten Eichsubstanzen
genannt werden. Es waren

1. **Androsteron**, Laufwert 1,00

Wie erwähnt, wird bei jeder PCG die Strecke, die Androsteron zurückgelegt hat, gleich 1,00 gesetzt und die Laufwerte der anderen Substanzen danach berechnet.

2. **Adrenosteron**, Laufwert 0,51 — 0,54, UV +++

3. **Dehydroisoandrosteron**, Laufwert 0,79 — 0,83

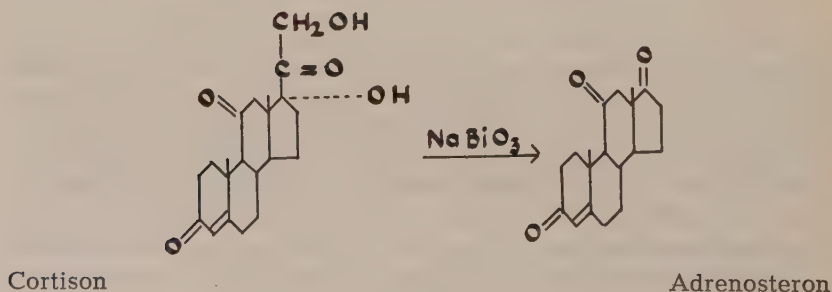
EXPERIMENTELLE ERGEBNISSE

Zunächst ist darauf hinzuweisen, daß die angegebenen, kolorimetrischen Werte, wie sie bei der Verarbeitung der wässrigen Hormonlösungen gefunden wurden, Mittelwerte aus drei (Cortison und Hydrocortison) bzw. zwei (Prednison) gesonderten Versuchsreihen darstellen. Parallelversuche sind außerdem ausgeführt worden bei der Erlernung der Methodik, weiterhin zur Beurteilung der SCHILD'schen Vorschrift (s. o.). Desgleichen sind verschiedene Urinversuche, vornehmlich solche, bei denen dem Urin Hormone zugesetzt wurden, in getrennten Arbeitsgängen doppelt ausgeführt worden, einmal, um die gewonnenen Ergebnisse zu überprüfen, zum anderen, um die Schwankungsbreite der Bestimmungsmethode festzustellen, die nach unseren Beobachtungen ± 10 bis 15% nicht überschritten hat.

Insgesamt liegen dieser Arbeit über 120 ketogene Steroidbestimmungen zu Grunde, wobei jede einzelne Probe mit den drei kolorimetrischen Modifikationen der Zimmermannschen Reaktion numerisch erfaßt wurde. Die papierchromatographischen Ergebnisse sind aus über 100 Einzelauftrennungen hervorgegangen, von denen eine Reihe als Doppelversuche mit verschiedenen Mengen des jeweils aufgetragenen Hormons vorgenommen wurden. — —

I. Cortison

Nach den geschilderten, theoretischen Überlegungen entsteht aus Cortison auf dem Wege der Oxydation mit Natriumwismutat Adrenosteron:



Die Bestimmung der kolorimetrischen Werte nach NaBiO₃-Oxydation des Cortisons, ausgedrückt in DHA-Äquivalenten, ergab:

	Soll	Ist mit Hydrolyse			Ist ohne Hydrolyse		
Cortison nach Oxydation mg/L	250,0	109,0	315,0	50,0	110,0	318,0	52,0
Modifikation		I	II	III	I	II	III
Ausbeute in %	100,0	43,6	126,0	20,0	44,0	127,2	20,8
Verhältnis		1 :	2,88 :	0,46	1 :	2,86 :	0,47

Tabelle 1

An diesen Werten fällt auf, daß 1.) im Gegensatz zu den Angaben von NORYMBERSKI und Mitarb. die Ausbeute bei Anwendung der Modifikation I (CALLOW) gering ist, daß 2.) die Unterschiede zwischen den einzelnen Kolorimetriarten ungeheuer groß sind, daß 3.) ein Einfluß der HCl-Hydrolyse praktisch nicht festzustellen ist.

Um die Vorgänge genauer zu studieren, muß zunächst die Frage geklärt werden, ob bei der Oxydation des Cortisons wirklich Adrenosteron entsteht. Darüber gibt die Papierchromatographie Auskunft: Bei der Auftrennung wismutatoxydierten Cortisons erkennt man konstant eine Substanz, die eine Spur (etwa 2—4%) langsamer läuft als natives Adrenosteron und die ebenso wie dieses eine UV-Absorption bei 250m μ zeigt. Daneben finden sich geringe Spuren einer etwas schneller als DHA und einer etwas schneller als Androsteron, sowie Spuren einer ganz langsam laufenden Substanz. Eine UV-Aktivität ist hier nicht festzustellen. Zwischen dem hydrolysierten und dem nicht hydrolysierten Produkt besteht kein erkennbarer Unterschied. (s. Abb. 1). Demnach scheint der Schluß berechtigt, daß bei der Oxydation aus dem Cortison ein ganz geringfügig verändertes, im großen und ganzen aber chemisch kaum anders als Adrenosteron reagierendes Hauptprodukt entsteht.

Zur weiteren Prüfung ist nun zu untersuchen, wie sich natives Adrenosteron verhält, wenn man es den entsprechenden Versuchsbedingungen unterwirft. Adrenosteron wird zunächst direkt kolorimetriert, um sein Farbäquivalent bezüglich DHA festzustellen. Dann wird es mit Äther und Benzol (NORYMBERSKI) ausgeschüttelt und schließlich noch nach Oxydation mit und ohne Hydrolyse mit Äther ausgeschüttelt und jeweils kolorimetriert, um festzustellen, ob Unterschiede in der Ausschüttelbarkeit vorliegen und ob sich

- 1 u. 4: Eichstreifen
 2: Cortison, oxydiert,
 hydrolysiert,
 3: Cortison, oxydiert,
 nicht hydrolysiert.

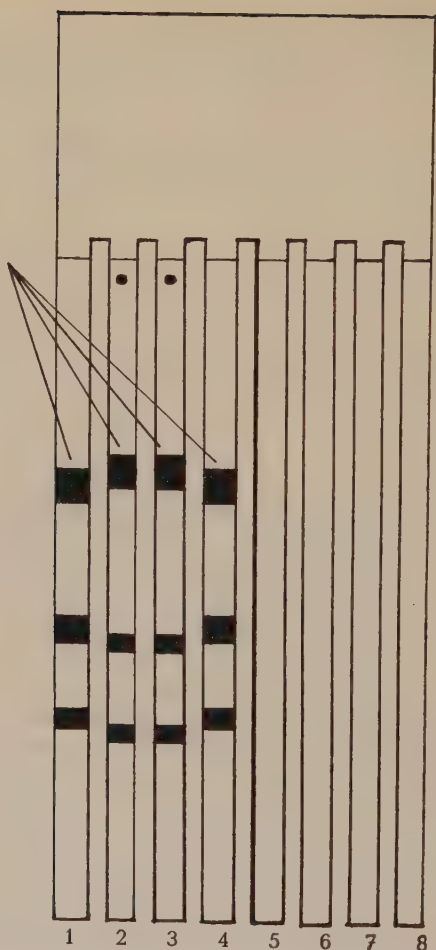
UV +++

Adrenosteron

DHA

Androsteron

— Abb. 1 —



das Adrenosteron unter den Oxydations- bzw. Hydrolysemanipulationen verändert. Die direkte Kolorimetrie ergab folgendes Ergebnis:

Modifikation	I	II	III
% DHA-Äquivalent	95,4	246,0	51,2
Verhältnis	1	: 2,58	: 0,54

Tabelle 2

Den hohen Wert in Modifikation II kann man wohl dahingehend erklären, daß bei dieser Methode hier ein erheblicher Korrekturfehler entsteht, weil die Farbe zum größeren Teil bei $530m\mu$ liegt und die Störchromogene bei $420m\mu$ weniger in Erscheinung treten. Die Intensität der Farbe läßt sich vor allem auf die dreifache Ketokonfiguration des Adrenosteronmoleküls zurückführen, da ja jede Ketogruppe mit DNB reagiert. Der Farbstoffkomplex Adrenosteron/DNB scheint außerdem eine verschiedenartige Löslichkeit zu haben. Darauf deutet der niedrige Wert in Modifikation III. Offenbar ist die Löslichkeit des Komplexes Adrenosteron/DNB in KOH/Alkohol besser als in $CHCl_3$, sodaß in die Chloroformphase nur wenig Farbe übertritt.

Die Versuche zur Ausschüttelbarkeit ergaben folgende Werte (in % DHA-Äquivalente):

	Soll	Ist		
		I	II	III
Adrenosteron ohne Oxydation/Äther	100,0	41,0	115,0	20,6
Adrenosteron ohne Oxydation/Benzol	100,0	89,2	228,0	50,2
Adrenosteron oxydiert, hydrolysiert, Äther	100,0	40,0	116,0	20,5
Adrenosteron oxydiert, nicht hydrolysiert, Äther	100,0	42,6	117,5	20,6

Tabelle 3

Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, daß die Werte nach Ätherausschüttelung weitgehend denen des oxydierten und ebenfalls mit Äther ausgeschüttelten Cortisons gleichen, während die Extraktion mit Benzol, welches NORBYN-BERSKI und Mitarb. zu diesem Zweck wählte, eine weitaus höhere Wiederauffindung des Hormons gewährleistet.

Wenn man nun berücksichtigt, daß die gefundenen Werte in DHA-Äquivalenten angegeben sind und man zur Erfassung der wirklichen Menge Adrenosteron die spezifischen Farbäquivalente einsetzt, so ändern sich die Werte folgendermaßen: (Angabe in %)

	Soll	Ist		
		I	II	III
Adrenosteron ohne Oxydation/Äther	100,0	43,0	46,7	40,2
Adrenosteron ohne Oxydation/Benzol	100,0	93,6	92,6	98,1
Adrenosteron oxydiert, hydrolysiert, Äther	100,0	42,0	47,1	40,0
Adrenosteron oxydiert, nicht hydrolysiert, Äther	100,0	44,6	47,7	40,2

Tabelle 4

Aus vorstehender Tabelle wird klar, daß Adrenosteron und damit auch das oxydierte Cortison, das ja, wie die PCG bewies, praktisch in Adrenosteron überführt wird, mit Benzol sehr gut ausschüttel- und wiederauffindbar ist, was die Mitteilungen von NORIMBERSKI und Mitarb. bestätigt, daß hingegen die Ausschüttelung mit Äther nur 40—47 % des Hormons aus der wässrigen Phase herauslöst. Wenn man nun die mg/L (Ist-Werte) des oxydierten Cortisons unter Berücksichtigung des Farbäquivalentes für Adrenosteron in mg/L Adrenosteron umrechnet, sowie diesen Wert unter Berücksichtigung des Extraktionskoeffizienten aus Tab. 4 korrigiert, so erhält man folgende Zahlen, die gleichzeitig einen rechnerischen Beweis für die Richtigkeit der Ergebnisse darstellen (unter Zubilligung von ± 10 % Schwankungsbreite):

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Cortison, oxydiert, mg/L „Ist“, Tabelle 1	109,0	315,0	50,0	110,0	318,0	52,0
=mg/L Adrenosteron, Farb- äquiv.-Korrektur, Tabelle 2	114,0	128,0	97,5	115,0	129,0	102,0
‰ Ausbeute/Äther lt. Tab. 4, Mittelwert	43,2	47,2	40,1	43,2	47,2	40,1
mg/L oxydiertes Cortison, umgerechnet auf 100 ‰	264,0	271,0	243,0	266,0	273,0	253,0
Soll in mg/L = 100 ‰	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0
Ist in ‰	105,8	108,4	97,2	106,5	109,1	101,2

Tabelle 5

Nunmehr sollen die Ergebnisse nach in vitro-Zusatz von Cortison zum Urin besprochen werden. Die kolorimetrischen Werte sind folgende:

Urin 1

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Werte des Urins in mg/L DHA-Äquivalent	19,4	39,0	18,5	17,0	34,0	14,5
Verhältnis	1 :	2,01 :	0,95	1 :	2,0 :	0,85

Tabelle 6a

Modifikat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
nach Cortison-Zusatz, mg/l	37,4	29,6	57,0	45,0	36,5	20,0	35,0	22,0	52,0	38,0	32,5	16,5
Nach Cortison	56,6		33,3		8,3		27,8		22,2		11,1	
Verhältnis (Werte)	1 :		1,52 :		0,68		1 :		1,73 :		0,75	

Urin 1 nach Zusatz von 18 mg/l Cortison

Tabelle 6b

(Die Werte sind in DHA-Äquivalenten angegeben)

Urin 2

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Werte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	6,0	12,9	7,1	4,4	9,4	4,2
Verhältnis	1 :	2,15 :	1,18	1 :	2,14 :	0,96

Tabelle 7a

Modifikat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Nach Cortison-Zusatz, mg/L	31,0	22,8	37,9	40,5	32,1	10,1	29,4	15,7	34,4	22,2	29,2	10,1
0/0 Nachweis Cortison	67,2		110,5		12,0		45,2		51,2		8,8	
Verhältnis (Ist-Werte)	1 :		1,78 :		0,44		1 :		1,41 :		0,41	

Urin 2 nach Zusatz von 25 mg/l Cortison

Tabelle 7b

Urin 3

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	25,9	57,3	22,8	17,1	40,2	15,9
Verhältnis	1 :	2,11 :	0,88	1 :	2,35 :	0,88

Tabelle 8a

Modifikat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Nach Cortison-Zusatz, mg/L	48,9	33,2	80,3	66,7	45,8	30,2	40,1	26,8	63,2	51,5	38,0	23,3
0/0 Nachweis Cortison	31,8		40,9		32,2		42,2		49,2		39,1	
Verhältnis (Ist-Werte)	1 :		2,01 :		0,91		1 :		1,17 :		0,93	

Urin 3 nach Zusatz von 23 mg/l Cortison

Tabelle 8b

Urin 4

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Werte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	9,6	17,2	12,9	8,0	14,8	11,1
Verhältnis	1	: 1,80	: 1,34	1	: 1,85	: 1,39

Tabelle 9a

Modifikation	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
h. Cortison-Zusatz, mg/L	37,6	30,4	45,2	49,5	40,9	26,5	36,0	24,0	42,8	40,4	39,1	19,2
Nach Cortison	74,3		115,0		48,6		57,1		91,6		29,0	
Verhältnis (Werte)	1		1,63		0,87		1		1,68		0,80	

Urin 4 nach Zusatz von 28 mg/l Cortison

Tabelle 9b

Bei der Auswertung der kolorimetrischen Ergebnisse, wie sie in den Tabellen 6 bis 9 geschehen ist, stellt sich heraus, daß das zugesetzte Cortison in prozentual sehr unterschiedlichen Mengen bei Anwendung jeweils der gleichen kolorimetrischen Modifikation gefunden wird. Das Verhältnis der verschiedenen Kolorimetriearten untereinander bleibt ebenfalls in keinem Fall konstant oder ähnlich. Lediglich bei Urin 2 und 3 zeigt Modifikation I bei den nicht hydrolysierten Ansätzen die erwarteten Werte, während im übrigen der Wert der nicht hydrolysierten Probe von Urin 1 deutlich, der der hydrolysierten Probe von Urin 3 mäßig erniedrigt ist. Alle übrigen zeigen indessen eine teilweise bis 75 %ige Überhöhung des erwarteten Ergebnisses. Die Modifikation II erreicht nur in zwei Fällen (bei den hydrolysierten Ansätzen von Urin 2 und 4) knapp die erwartete Ausbeute, sonst liegen hier die Werte stets wesentlich unter den theoretisch errechenbaren. Modifikation III zeigt nirgends eine Übereinstimmung mit theoretischen Werten. Urin 1 und 2 zeigen sehr niedrige, Urin 3 und 4 teilweise bis doppelt so hohe Werte, wie sie den Erwartungen entsprächen.

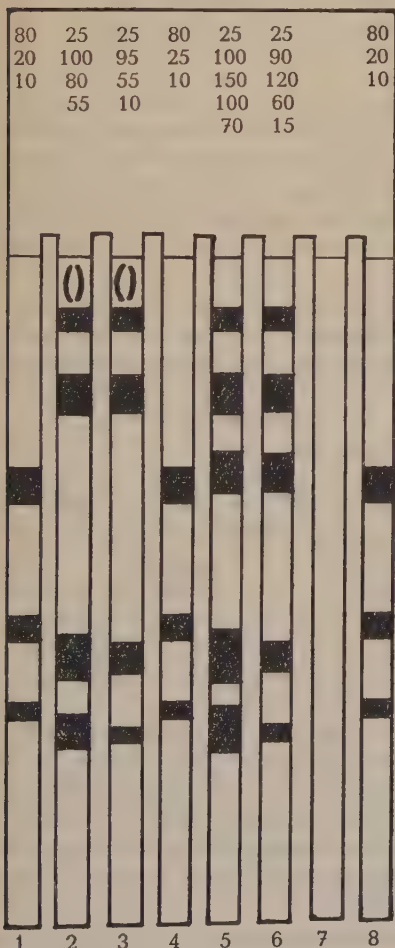
Anhand dieser Ergebnisse scheint es nicht möglich zu sein, im Urin mit Hilfe der Kolorimetrie das oxydierte Cortison ebenso nachzuweisen, wie in reiner, wässriger Lösung. Es liegt somit der Schluß nahe, daß der Urin, seiner jeweiligen Zusammensetzung entsprechend, Veränderungen in der Nachweisbarkeit des zugesetzten Cortisons bedingt. Versuche in der hiesigen Klinik scheinen diese Vermutung weitgehend zu bestätigen; danach konnte gezeigt werden, daß z. B. mit Harnstoff- und Natriumchloridzusätzen in jeweils verschiedenen Verhältnissen die Wiederauffindbarkeit von oxydierten Harnsteroiden aus ihren wässrigen Lösungen stark verändert werden konnte.

Die Urinproben 1 und 2 sind von mir papierchromatographisch aufgetrennt worden und zwar sowohl vor als auch nach der Applikation von Cortison. Dabei konnten qualitativ die gleichen Fraktionen gefunden werden, die bei der Auftrennung der wässrigen Cortisonlösung auftraten, jedoch bis auf die ganz langsam laufende Substanz, die nicht eindeutig gefunden wurde. Abbildung 2 zeigt schematisch auf Streifen 2 und 3 die Auftrennung des nativen Urins 1 mit und ohne Hydrolyse. Es färben sich 4 Fraktionen an, von denen die beiden unteren nach Hydrolyse eine deutliche Zunahme ihrer Farbintensität zeigen. (Die Zahlen über den einzelnen Streifen bedeuten die im Vergleich zu mengenmäßig bekannten Eichsubstanzen geschätzten gamma der entstandenen Fraktionen).

Außerdem erweisen sich die beiden letztgenannten Fraktionen hinsichtlich ihrer Laufgeschwindigkeit identisch mit den beiden unteren Fraktionen des wässrigen, oxydierten Cortisons, die dort nur als geringe Spuren auftraten. Diese Feststellung ist insofern von Bedeutung, als nach Zusatz von Cortison die beiden letzten Urinfraktionen des hydrolysierten Ansatzes eine intensivere Anfärbung zeigen, ein Effekt, der bei dem nicht hydrolysierten Ansatz dieses Extraktes nicht eindeutig nachzuweisen ist. Dazu tritt in beiden Fällen die erwartete Adrenosteronfraktion auf (Abb. 2, Streifen 5 und 6).

Die Auftrennung von Urin 2 läßt diesen Befund noch deutlicher hervortreten. Der Nativurin zeigt 2 Fraktionen ohne Hydrolyse, diese bewirkt das Auftreten einer dritten, ganz schnell laufenden Substanz, offenbar auf Kosten der zweiten Fraktion. (Abb. 3, Streifen 2 und 3). Nach Zusatz von Cortison erscheinen nun außer dem erwarteten Adrenosteron zwei neue, deutlich sich anfärbende Fraktionen, die in ihrer Laufgeschwindigkeit den beiden unteren Spurfractionen des wässrigen, oxydierten Cortisons entsprechen. Dies ist, von geringen, graduellen Unterschieden abgesehen, sowohl bei dem hydrolysierten als auch bei dem nicht hydrolysierten Ansatz der Fall, wobei bemerkenswert ist, daß die etwas schneller als DHA laufende Fraktion in ihrer Farbintensität die Adrenosteronfraktion übertrifft. Es kann somit als erwiesen angesehen werden, daß 1.) Cortison, das in vitro einem Urin zugesetzt wurde, papierchromatographisch mit den gleichen Fraktionen wie in seiner wässrigen Lösung nachweisbar bleibt. daß 2.) der Urin auf Grund seiner jeweiligen Zusammensetzung mehr oder minder große Veränderun-

1, 4 u. 8: Eichstreifen
 2 u. 3: Nativurin, Aus-
 gangsmenge 270 γ
 (Mod. I, hydrolys.
 Probe)
 5 u. 6: Nach Zusatz, Aus-
 gangsmenge 400 γ
 (Mod. I, hydrolys.
 Probe)
 2 u. 5: hydrolysiert
 3 u. 6: nicht hydrolysiert



— Abb. 2 —

1, 4 u. 8: Eichstreifen
 2 u. 3: Nativurin, Aus-
 gangsmenge 80 γ
 (Mod. I, hydrolys.
 Probe)
 5 u. 6: Nach Zusatz, Aus-
 gangsmenge 150 γ
 (Mod. I, hydrolys.
 Probe)
 2 u. 5: hydrolysiert
 3 u. 6: nicht hydrolysiert



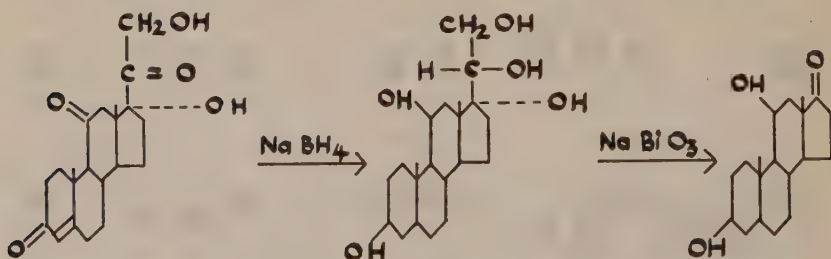
— Abb. 3 —

gen in dem Verhältnis der Oxydationsprodukte bedingt, insofern, als auf Kosten der Adrenosteronfraktion die beiden unteren Spurfractionen der wässrigen, oxydierten Cortisonlösung deutlicher hervortreten. Letzteres veranlaßt zu der Vermutung, daß Cortison nicht nur im Sinne der Wismutatoxydation verändert wird. Die fehlende UV-Aktivität der Spurfractionen scheint dafür zu sprechen, daß u. a. die für die UV-Absorption verantwortliche, ungesättigte Doppelbindung im Anschluß an C3 im Adrenosteronmolekül verloren geht und es ist theoretisch denkbar, daß, je nach Eigenart des Urins, die Adrenosteronfraktion einmal ganz zu Gunsten der beiden anderen Fractionen verschwinden kann. So können diese Ergebnisse einen weiteren Faktor zur Erklärung der unregelmäßigen, kolorimetrischen Resultate abgeben.

. — . — .

Im folgenden Abschnitt haben wir uns mit der Verwendung des Natriumborhydrids (NaBH_4) in der analytischen Steroidbestimmung befaßt. Die theoretischen Überlegungen basieren, wie im Rahmen einleitender Erörterungen aufgezeigt, auf der Tatsache, daß die Steroide vor der Oxydation reduziert werden und dabei alle Ketogruppen in Hydroxylgruppen umgewandelt werden.

Bei Anwendung dieser Manipulationen auf Cortison in wässriger Lösung müßte 3-, 11-, 17-, 20-tetrahydroxy-5 β -Pregnan entstehen. Die Wismutatoxydation trennt dann, wie üblich, die Seitenkette ab, sodaß 3-, 11-dihydroxy-17-keto-Aetiocholan entsteht:



Es ist aber auch die Möglichkeit zu berücksichtigen, daß die Hydrierungsvorgänge am Steroidmolekül nicht vollständig ablaufen und außerdem die neu entstehenden H- und OH-Gruppen in α - und β -Positionen auftreten können; das würde bedeuten, daß das Gleichgewicht dieser Reaktion in einem Gemisch von verschiedenartig hydrierten Steroidmolekülen besteht, das seinerseits wieder von der Eigenart des Ausgangsproduktes bestimmt werden könnte.

Bei der Kolorimetrie des hydrierten und anschließend mit NaBiO_3 oxydierten Cortisons erhielten wir folgende Ergebnisse:

	Soll	Ist mit Hydrolyse			Ist ohne Hydrolyse			
Cortison nach Vorh. m. NaBH4 u. Oxydation (mg/L)	250,0	125,0	150,0	137,4	112,2	141,0	120,0	
Modifikation		I	II	III	I	II	III	
Ausbeute in %	100,0	50,0	60,0	55,0	44,8	56,4	48,0	
Verhältnis		1	:	1,20	:	1,10	:	1,07

Tabelle 10

Ein Vergleich vorstehender Tabelle mit Tabelle 1, in der die entsprechenden Werte des oxydierten Cortisons ohne NaBH₄-Vorbehandlung aufgestellt sind, zeigt deutlich, daß besonders die Modifikationen II und III gänzlich andere Ergebnisse liefern. Modifikation II ist im Vergleich zu Tabelle 1 stark erniedrigt, Modifikation III stark erhöht, beide im Sinne einer Nivellierung der drei Modifikationen untereinander verändert, wobei sich Modifikation I nur wenig erhöht. Damit dürfte schon rein kolorimetrisch nachgewiesen sein, daß durch die NaBH₄-Vorbehandlung — den theoretischen Überlegungen entsprechend — andere Ketosteroide als bei bloßer Oxydation entstehen, die mit Adrenosteron natürlich nicht mehr verglichen werden können.

Die papierchromatographische Auftrennung des nach NaBH₄-Vorbehandlung und anschließender Oxydation aus Cortison entstehenden Produktes beweist nun tatsächlich die Entstehung mehrerer, verschiedener Ketosteroide. Aus Abbildung 4 ist deutlich ersichtlich, daß gegenüber dem nach bloßer Oxydation von Cortison in der Hauptsache entstehenden Adrenosteron nunmehr 4 langsam laufende Fraktionen gefunden werden, die sich nach Hydrolyse in 6 Fraktionen weiter aufspalten. Dies kann als Beweis einer Mischung von Hydrierungsprodukten und optisch verschiedenen Isomeren angesehen werden.

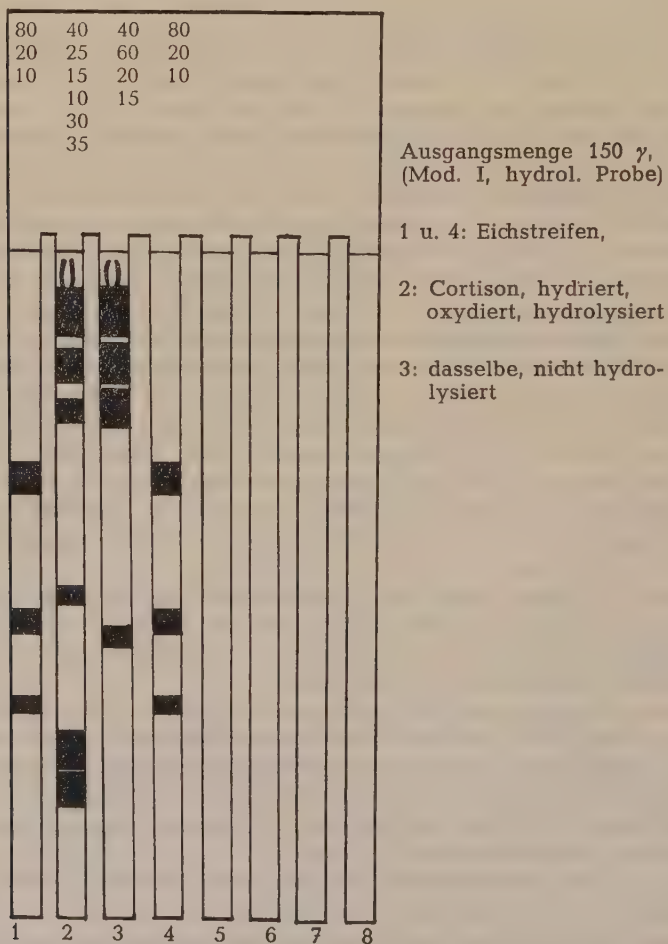
Es würde den Rahmen dieser Arbeit erheblich überschreiten, wollte man versuchen, die Annahme optischer Isomere bzw. nur teilweise reduzierter Steroide durch gesonderte Versuche zu belegen und weiterhin die Konstitution der einzelnen Spaltprodukte aufzuklären.

Von den 4 Fraktionen der nicht hydrolysierten Probe, wie sie in Abbildung 4 dargestellt sind, dürfte die zweite mit dem Laufwert von 0,21 dem nach der Theorie entstandenen 3-, 11-dihydroxy-17-keto-Aetiocholan entsprechen. Die Hydrolyse bewirkt neben den erwähnten 2 weiteren Fraktionen deutliche Verschiebungen in Umfang und Intensität der zweiten Fraktion, offenbar zu Gunsten der neu entstandenen.

Man könnte nun unter Berücksichtigung des Farbäquivalentes und der Extrahierbarkeit des 3-, 11-dihydroxy-17-keto-Aetiocholans die Werte der Tabelle 10 analog zu der Adrenosteronkorrektur beim oxydierten Cortison ohne NaBH₄-Vorbehandlung umrechnen. Dies ist jedoch unbefriedigend, weil die

theoretisch entstehende Substanz in Wirklichkeit nur etwa 50 % der Spaltprodukte ausmachen dürfte und so von vorne herein ein Fehler entsteht, der die Bedeutung solcher Werte entscheidend mindern würde.

Zwei Urinen wurde nun Cortison zugesetzt, sie wurden mit NaBH_4 vorbehandelt und anschließend oxydiert, nachdem die Nativwerte des Urins vorher unter Anwendung der gleichen Manipulationen bestimmt worden waren. Die Kolorimetrie ergab:



— Abb. 4 —

in a)	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Modifikation						
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalent	9,3	23,0	11,3	7,0	19,0	7,5
Verhältnis	1	: 2,47	: 1,22	1	: 2,72	: 1,07

Tabelle 11a

Modifikat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
nach Cortison-Zu- satz, mg/L DHA-Äquiv.	18,3	15,6	32,0	23,5	20,3	10,9	14,0	9,5	26,0	19,1	14,5	7,4
Nach- weis Corti- son	70,0		5,4		—		35,7		1,4		—	
Verhältnis (Werte)	1	:	1,50	:	0,69		1	:	2,01	:	0,78	
	+ 9,0 mg/L Cortison						+ 7,0 mg/L Cortison					

Tabelle 11b

in b)	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Modifikation						
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalent	3,4	6,2	2,3	2,8	5,9	1,2
Verhältnis	1	: 1,82	: 0,68	1	: 2,10	: 0,43

Tabelle 12a

Modifikat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
nach Cortison-Zu- satz, mg/L DHA-Äquiv.	13,4	8,4	16,2	8,1	12,3	3,0	12,8	5,6	15,9	8,6	11,2	2,8
Nach- weis Corti- son	50,0		19,0		7,0		28,0		17,0		16,0	
Verhältnis	1	:	0,95	:	0,28		1	:	1,54	:	0,50	
	+ 10 mg/L Cortison						+ 10 mg/L Cortison					

Tabelle 12b

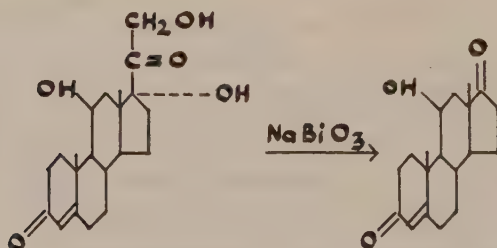
Die in den vorstehenden Tabellen aufgeführten Werte lassen keinerlei Regelmäßigkeit im Nachweis des Cortisons nach Zusatz zum Urin, NaBH_4 -Vorbehandlung und anschließender Oxydation erkennen. Verschiedene Urine bedingen offenbar eine gänzlich variable Nachweisbarkeit. Ebenso scheint hier das Hormon von den drei Modifikationen sehr unterschiedlich erfaßt zu werden, im Gegensatz zu der wässrigen Cortisonlösung, bei der das Verhältnis der Modifikationen zueinander rund 1:1:1 war. Es ist anzunehmen, daß auch hier die Zusammensetzung des Urins für die Nachweisbarkeit des zugesetzten Hormons eine bedeutsame Rolle spielt.

Die Beurteilung, wieweit die Vorbehandlung von Urinen mit NaBH_4 zur Bestimmung der KGS in einem Arbeitsgang zu bevorzugen ist, steht hier nicht zur Entscheidung und Diskussion. Unter Berücksichtigung der geschilderten Experimente kann nur geschlossen werden, daß NaBH_4 auf Cortison in reiner, wässriger Lösung und sicher auch als Zusatz zum Urin eine stark verändernde Wirkung ausübt, die wohl nicht einheitlich vonstatten gehen dürfte und damit die Möglichkeit, nach Oxydation eine qualitative Bestimmung vorzunehmen, praktisch nicht mehr gegeben ist. Damit erscheint die Methode zu Eichzwecken nicht brauchbar zu sein.

. — . — .

II. Hydrocortison

Hydrocortison wird der Theorie zufolge durch die Natriumwismutatoxydation zu 11-hydroxy-3-, 17-diketo-Androst-4-en umgewandelt:



Bei der Oxydation des Hydrocortisons in wässriger Lösung erhält man folgende kolorimetrischen Werte, ausgedrückt in DHA-Äquivalenten:

	Soll	Ist ohne Hydrolyse			Ist mit Hydrolyse		
Hydrocortison oxydiert, mg/L	250,0	107,0	67,5	40,0	108,0	68,0	40,5
Modifikation		I	II	III	I	II	III
Ausbeute in %	100,0	42,8	27,0	16,0	43,2	27,2	16,2
Verhältnis		1 :	0,63 :	0,27	1 :	0,63 :	0,27

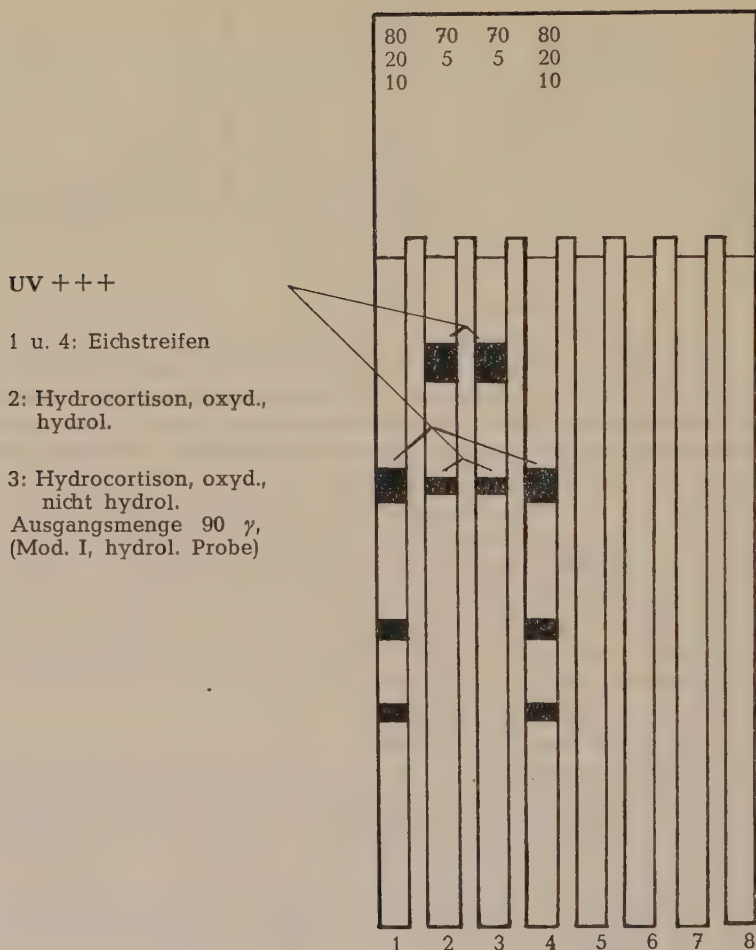
Tabelle 13

Diese Werte lassen erkennen, daß die Ausbeute wiederum sehr gering ist, vor allem sieht man in Modifikation II im Gegensatz zu den entsprechenden Werten des oxydierten Cortisons einen erheblichen Abfall. Zur genaueren Untersuchung wurde nun zunächst das Oxydationsprodukt des Hydrocortisons papierchromatographisch aufgetrennt. Dabei zeigte sich, daß die Wismutoxydation aus dem Hormon zwei Produkte entstehen läßt, und zwar 1.) eine Hauptfraktion mit einer mittleren Laufgeschwindigkeit von 0,24 — 0,28, die ein wenig langsamer läuft als das 3-hydroxy-11-, 17-diketo-Aetiocholan und sicherlich das theoretisch erwartete Ketosteroid darstellt, 2.) eine weitere Fraktion mit etwa 10% der Farbe und einer Laufgeschwindigkeit von 0,51-0,55 im Mittel, was besagt, daß diese Fraktion mit großer Wahrscheinlichkeit aus Adrenosteron besteht. Beide Fraktionen zeigen eine Absorption des ultra-violetten Lichtes bei 250 m μ ; (Abb. 5).

In Analogie zu den Untersuchungen beim Cortison wird nun das Farbüquivalent und die Ausschüttelbarkeit des Hydrocortison-Oxydationsproduktes ermittelt, welches mit Benzol- und Ätherextraktion und nach mehrfachem Umkristallisieren in Substanz gewonnen wurde. Das Ergebnis der direkten Kolorimetrie einer alkoholischen, 10 mg%/igen Lösung ist in Tabelle 14 zusammengestellt. Wird die erhaltene Substanz nun in 50%/igem Eisessig gelöst und teils mit, teils ohne Oxydation mit Äther oder Benzol extrahiert, so ergeben sich die Werte der Tabelle 15, die denen nach direkter Oxydation

Modifikation	I	II	III
% DHA-Äquivalent	60,0	35,5	22,5
Verhältnis	1 :	0,59 :	0,37

Tabelle 14



— Abb. 5 —

und Kolorimetrie von Hydrocortison praktisch gleich sind, d. h. auch bei Verwendung des Oxydationsproduktes als Substanz erhält man die gleichen niedrigen Werte, besonders in Modifikation II und III. Weiterhin geht aus Tabelle 15 hervor, daß die Oxydations- und Hydrolysemanipulationen keine Veränderungen an dem Oxydationsprodukt des Hydrocortisons setzen. Unter Berücksichtigung des jeweiligen Farbüquivalentes (Tabelle 14) kann man nun die tatsächlich extrahierbare Menge des oxydierten Hydrocortisons ermitteln (Angabe in %, Tabelle 16).

Modifikation	Soll	Ist		
		I	II	III
HC-Ox, ohne Oxydation/Äther	100,0	43,5	26,6	17,0
HC-Ox, ohne Oxydation/Benzol	100,0	56,0	33,0	22,0
HC-Ox, oxydiert, hydrol. Äther	100,0	43,0	26,1	16,8
HC-Ox, oxydiert, nicht hydrol. Äther	100,0	43,2	26,4	17,2

Tabelle 15 (Angaben in%)

Modifikation	Soll	Ist		
		I	II	III
HC-Ox, ohne Oxydation/Äther	100,0	72,5	75,0	75,5
HC-Ox, ohne Oxydation/Benzol	100,0	93,5	93,0	97,9
HC-Ox, oxydiert, hydrol., Äther	100,0	71,6	73,5	74,6
HC-Ox, oxydiert, nicht hydrol. Äther	100,0	72,0	74,4	76,5

Tabelle 16

Auch bei Hydrocortison ist demnach die Ausschüttelbarkeit mit Benzol nach erfolgter Oxydation als sehr gut zu bezeichnen. Die Ätherextrahierbarkeit liegt hier um 74 % und ist damit deutlich höher als beim oxydierten Cortison, von dem auf diese Weise nur etwa 45 % aus der wässrigen Phase her-
ausgelöst werden konnten.

Wenn man jetzt die mg/L-Werte des wässrigen, oxydierten Hydrocortisons unter Berücksichtigung von Farbäquivalent und Extraktionskoeffizienten umrechnet und korrigiert, so erhält man wieder als rechnerische Kontrolle die in Tabelle 17 zusammengestellten Zahlen.

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Hydrocortison, oxydiert, mg/L „Ist“, Tabelle 13	107,0	67,5	40,0	108,0	68,0	40,0
=mg/L HC-Ox, Farbäquiv.- Korrektur Tabelle 14	178,0	190,0	178,0	180,0	191,5	180,0
‰ Ausbeute/Äther lt. Tab. 16, Mittelwert	72,0	74,4	75,5	72,0	74,4	75,5
mg/L oxydiertes Hydrocortison, umgerechnet auf 100 ‰	247,0	256,0	236,0	250,0	257,5	239,0
Soll in mg/L = 100 ‰	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0	250,0
Ist in ‰	98,9	102,5	94,5	100,0	103,0	95,0

Tabelle 17

— . — . — .

Die kolorimetrischen Ergebnisse nach in vitro-Zusatz von Hydrocortison zum Urin, ausgedrückt in DHA-Äquivalenten, waren folgende:

Urin 1

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalent	19,4	39,0	18,5	17,0	34,0	14,0
Verhältnis	1	: 2,01	: 0,95	1	: 2,00	: 0,86

Tabelle 18a

Präparat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Hydrocortison-Zusatz, mg/L	37,4	28,6	57,0	42,0	36,5	19,0	35,0	20,9	52,0	31,0	32,5	15,0
Nachweis Hydrocortison	51,0		16,7		2,8		21,7		—		2,8	
Verhältnis (Werte)	1 :		1,47 :		0,66		1 :		1,48 :		0,72	

Urin 1 nach Zusatz von 18 mg/l Hydrocortison
Tabelle 18b

Urin 2

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
	Soll	Ist	Verhältnis	Soll	Ist	Verhältnis
Präparatwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	6,0	12,9	7,1	4,4	9,4	4,2
Verhältnis	1 :	2,15 :	1,18	1 :	2,14 :	0,95

Tabelle 19a

Präparat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Hydrocortison-Zusatz, mg/L	31,0	18,0	37,9	33,0	32,1	14,7	29,4	17,6	34,4	29,6	29,2	10,4
Nachweis Hydrocortison	48,0		80,4		30,4		52,8		80,5		24,8	
Verhältnis (Werte)	1 :		1,84 :		0,97		1 :		1,68 :		0,59	

Urin 2 nach Zusatz von 25 mg/l Hydrocortison
Tabelle 19b

Urin 3

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	15,3	33,4	10,5	11,2	27,8	8,7
Verhältnis	1 :	2,20 :	0,69	1 :	2,48 :	0,73

Tabelle 20a

Modifikat.	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Nach Hydrocortison Zusatz, mg/L	25,3	20,3	43,4	40,1	20,5	14,8	21,2	15,7	37,8	33,2	18,1	14,8
o/o Nachw. Hydrocortison	50,0		67,0		43,0		45,0		54,0		30,0	
Verhältnis (Ist-Werte)	1 :		1,97 :		0,73		1 :		2,12 :		0,71	

Urin 3 nach Zusatz von 10 mg/l Hydrocortison

Tabelle 20b

Die Werte der Tabellen 18—20 lassen, wie bei Cortisonzusatz, eine recht uneinheitliche Nachweisbarkeit des Hormons bzw. seines Oxydationsproduktes erkennen. Lediglich die Werte der Modifikation I erweisen sich bis auf die nicht hydrolysierte Probe von Urin 1 weitgehend konstant, wenngleich um etwa 10 % höher, als theoretisch berechenbar, ohne daß dies jedoch als Gesetzmäßigkeit anzusehen ist. In den beiden anderen Modifikationen lassen sich keine Regelmäßigkeiten erkennen. Während z. B. bei dem nicht hydrolysierten Ansatz von Urin 1 der Wert in Modifikation II nach Zusatz sogar noch unter dem Nativwert liegt — allerdings innerhalb der experimentellen Schwankungsbreite — zeigt sich bei Urin 2 ein Anstieg dieser Modifikation auf 80,5 % DHA-Äquivalente, ein Wert, der etwa 3 mal über dem erwarteten Ergebnis liegt. Bei dem dritten Urin erreicht man mit dieser Methode rund 2,5 mal die erwartete Nachweisbarkeit. Die Modifikation III zeigt ebenso erhebliche Differenzen, zwischen 2,8 und 43,0 % DHA-Äquivalent, auch sie lassen keine Regelmäßigkeit erkennen.

Somit dürfte in Analogie zu den Ergebnissen bei den entsprechenden Versuchen mit Cortison die Feststellung berechtigt sein, daß es nicht möglich

ist, Hydrocortison nach Wismutatoxydation im Urin mit Hilfe der drei kolorimetrischen Modifikationen quantitativ nachzuweisen. Es ist naheliegend, anzunehmen, daß auch die Nachweisbarkeit des oxydierten Hydrocortisons von der Zusammensetzung des Urins abhängig ist. Ob darüberhinaus auch qualitative Veränderungen an dem Oxydationsprodukt des Hydrocortisons anzunehmen sind, kann mit Hilfe der Papierchromatographie geklärt werden. Die Urine 1 und 2 sind in diesem Zusammenhang aufgetrennt worden. Die Abbildungen 6 und 7 zeigen das papierchromatographische Bild des Nativurins und das nach Hydrocortisonzusatz, jeweils hydrolysiert und nicht hydrolysiert.

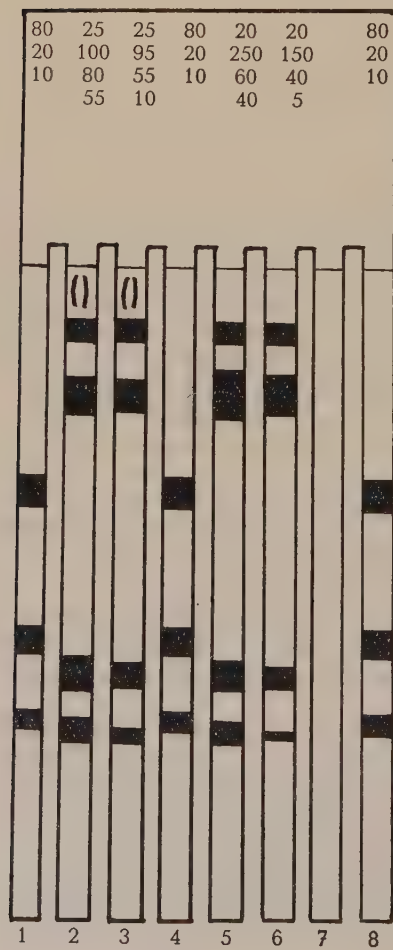
Im Papierchromatogramm des ersten Urins sieht man nach Hydrocortisonzusatz eine deutliche Zunahme der zweiten Urinfraktion, die in ihrem Laufwert etwas verlangsamt ist, nativ 0,34 — nach Zusatz 0,29. Die intensive Anfärbung der Fraktion zeigt jedoch an, daß hier das oxydierte Hydrocortison zu finden sein muß, daß seinerseits im Verhältnis zur Auftrennung seiner reinen, wässrigen Lösung etwas schneller zu laufen scheint. Dieser gering beschleunigte Laufwert der Hauptfraktion des oxydierten Hydrocortisons auf der einen, und der gering retardierte Laufwert der Urinfraktion auf der anderen Seite dürften wohl so zu erklären sein, daß die Auftrennbarkeit von zwei sehr eng beieinander liegenden Fraktionen bei Verwendung größerer Gammamengen erschwert ist. Dagegen ist die bei der Auftrennung der reinen, wässrigen Lösung gefundene Adrenosteronfraktion hier nicht mehr vorhanden, was bedeutet, daß dieser Urin den in wässriger Lösung stattfindenden Zerfall des oxydierten Hydrocortisons in zwei Produkte verhindert. Andersartig ist die Veränderung im zweiten Urin. Hier findet man von der eigentlichen Hauptfraktion des oxydierten Hydrocortisons nichts mehr wieder, hingegen färbt sich eine Fraktion in der typischen Hormonfarbe an, die vorher nicht im Chromatogramm des Nativurins zu finden war und demnach offensichtlich mit dem Hydrocortisonzusatz in Zusammenhang steht. Diese Fraktion zeigt einen etwas geringeren Laufwert als Adrenosteron. Es liegt somit die Erklärung nahe, daß es sich hier um die charakteristische Adrenosteronfraktion des oxydierten Hydrocortisons handelt, die ihrerseits wahrscheinlich im Sinne des aus dem Cortison entstehenden Adrenosterons verändert wird.

An diesen beiden Beispielen konnte also gezeigt werden, daß Hydrocortison nach Zusatz zum Urin deutlich verändert wird, wobei es auf den Urin ankommt, ob es z. B. zu einer Verschiebung der Hauptfraktion oder zu einer alleinigen Ausbildung der etwas veränderten Adrenosteronfraktion kommt. Andersartige Veränderungen sind darüberhinaus durchaus denkbar.

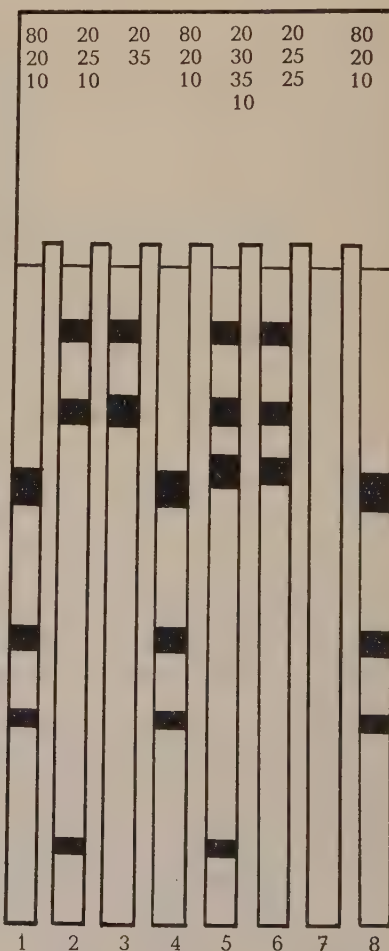
So ist also Hydrocortison als Zusatz zum Urin auch papierchromatographisch nicht in konstanter Form nachzuweisen, und es ist unschwer einzusehen, daß derartige Veränderungen sich in unregelmäßigen, kolorimetrischen Ergebnissen widerspiegeln.

1, 4 u. 8: Eichstreifen
 2 u. 3: Nativurin, Ausgangsmenge 270 γ
 (Mod. I, hydrol. Probe)
 5 u. 6: Nach Zusatz, Ausgangsmenge 340 γ
 (Mod. I, hydrol. Probe)
 2 u. 5: hydrolysiert
 3 u. 6: nicht hydrolysiert

1, 4 u. 8: Eichstreifen
 2 u. 3: Nativurin, Ausgangsmenge 80 γ
 (Mod. I, hydrol. Probe)
 5 u. 6: Nach Zusatz, Ausgangsmenge 100 γ
 (Mod. I, hydrol. Probe)
 2 u. 5: hydrolysiert
 3 u. 6: nicht hydrolysiert

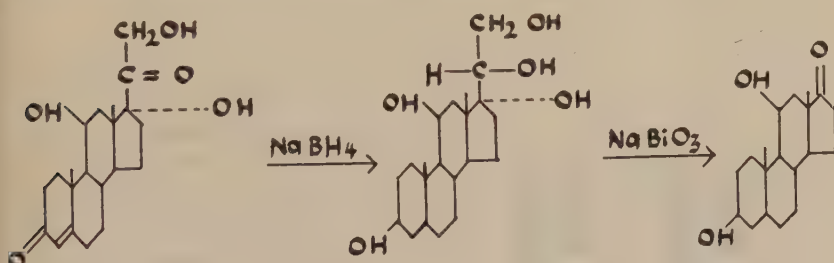


— Abb. 6 —



— Abb. 7 —

Hydrocortison wurde nun der Vorbehandlung mit NaBH_4 unterworfen und anschließend oxydiert. Dabei müßte theoretisch dasselbe 17-Ketosteroid entstehen, wie bei entsprechender Behandlung von Cortison, nämlich 3-, 11-dihydroxy-17-keto-Aetiocholan bzw. -Androstan.

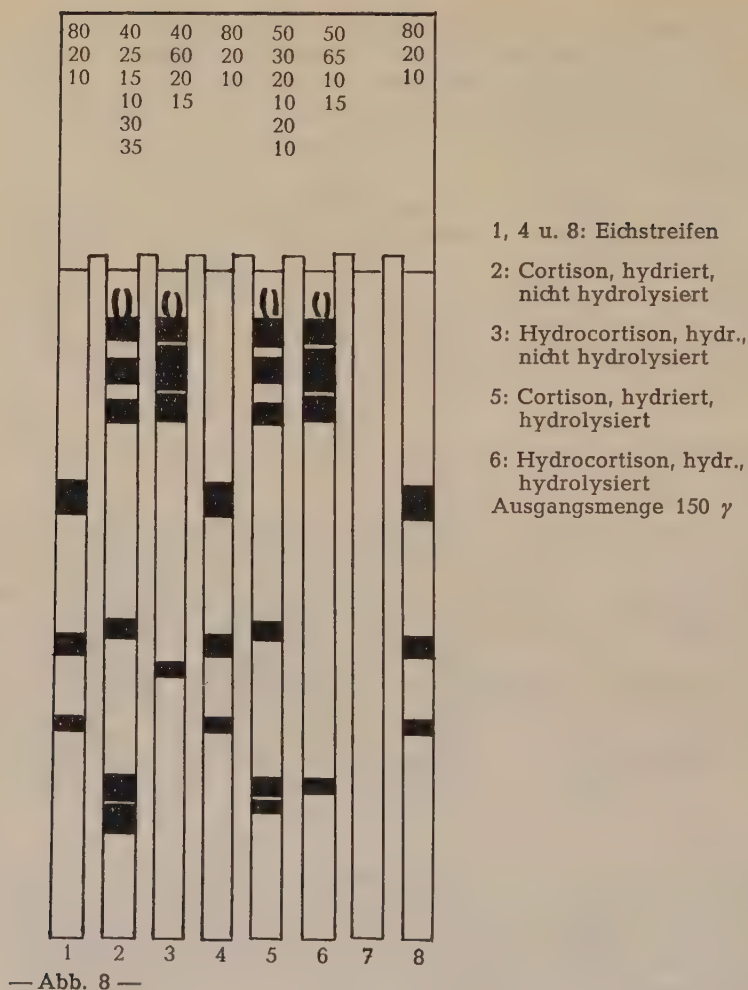


Die kolorimetrischen Ergebnisse nach Hydrierung und Oxydation waren folgende:

	Soll	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
Hydrocortison nach Vorbeh. m. NaBH_4 Oxydation, mg/L	250,0	123,0	134,0	98,0	117,0	128,0	88,0
Modifikation		I	II	III	I	II	III
Ausbeute in % OHA-Äquivalent	100,0	49,2	53,6	39,3	46,8	51,2	35,2
Verhältnis		1	: 1,09	: 0,80	1	: 1,09	: 0,75

Tabelle 21

Aus Tabelle 21 geht nun hervor, daß sich nach Behandlung mit NaBH_4 doch Unterschiede in den kolorimetrischen Ergebnissen, besonders deutlich in Modifikation III, zwischen Cortison und Hydrocortison ergeben. Dies scheint die oben dargelegte Vermutung zu bestätigen, daß die Eigenart des Ausgangsstoffes, also hier des Hydrocortisons, Einfluß auf die Hydrierbarkeit und damit auf die Zusammensetzung eines Gemisches von verschiedenen Hydrierungsprodukten hat. Darauf weist auch die PCG hin, bei der außer zwei gemeinsamen Fraktionen des hydrierten und oxydierten Cortisons bzw. Hydrocortisons in beiden Fällen noch andere Fraktionen entstehen. (s. Abb. 8). Bis auf diese wenig gravierenden Unterschiede ist jedoch bei Bearbeitung des Cortisons wie auch des Hydrocortisons mit NaBH_4 festzustellen, daß kolorimetrisch eine Nivellierung der drei Modifikationen bis zum Verhältnis von annähernd 1:1:1 stattgefunden hat. Die PCG zeigt ihrerseits deutlich die Veränderungen der Ausgangs- bzw. der Oxydationsprodukte, sodaß sich



die qualitative Identifizierung, wie oben dargelegt, entscheidend verschlechtert und damit das NaBH_4 in diesem Zusammenhang nicht brauchbar erscheint.

Der Vollständigkeit halber wurde auch ein Urin, dem Hydrocortison zugesetzt worden war, mit NaBH_4 hydriert und anschließend oxydiert. Wie erwartet, zeigte sich hier kein neuer Gesichtspunkt. (s. Tabelle 22).

Eine Korrektur der DHA-Äquivalent-Werte mit dem Farbäquivalent des nach Hydrierung und Oxydation aus dem Hydrocortison theoretisch entste-

henden Ketosteroids ist auch hier wenig sinnvoll, weil damit die in Wirklichkeit entstehenden, anderen Ketosteroide vernachlässigt werden müßten, was auf Grund ihres Anteils an der Summe der Hydrierungs- bzw. Oxydationsprodukte nicht gerechtfertigt ist.

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
ativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	9,3	23,0	11,3	7,0	19,0	7,5
Verhältnis	1	: 2,47	: 1,23	1	: 2,71	: 1,07

Tabelle 22a

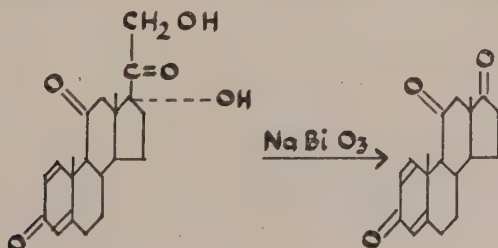
	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
Modifikat.	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Hydrocortison-Zu-, mg/L	18,3	15,0	32,0	25,0	20,3	12,5	14,0	11,8	26,0	19,9	14,5	8,0
Nachweis-Hydrocortison	63,4		22,3		13,3		68,6		12,9		7,1	
Verhältnis (Werte)	1 :		1,67 :		0,83		1 :		1,69 :		0,68	
	+ 9,0 mg/L Hydrocortison						+ 7,0 mg/L Hydrocortison					

(Angabe der mg/L-Werte in DHA-Äquivalenten)

Tabelle 22b

III. Prednison

Prednison ist bekanntlich ein synthetisches Steroid, das das gleiche Atomsk skelett wie Cortison besitzt, zusätzlich aber noch eine zweite Doppelbindung bei C1 hat (Δ^1 -Doppelbindung). Therapeutisch wirkt es im allgemeinen wie Cortison, nur kann man mit sehr viel geringeren Dosen auskommen.



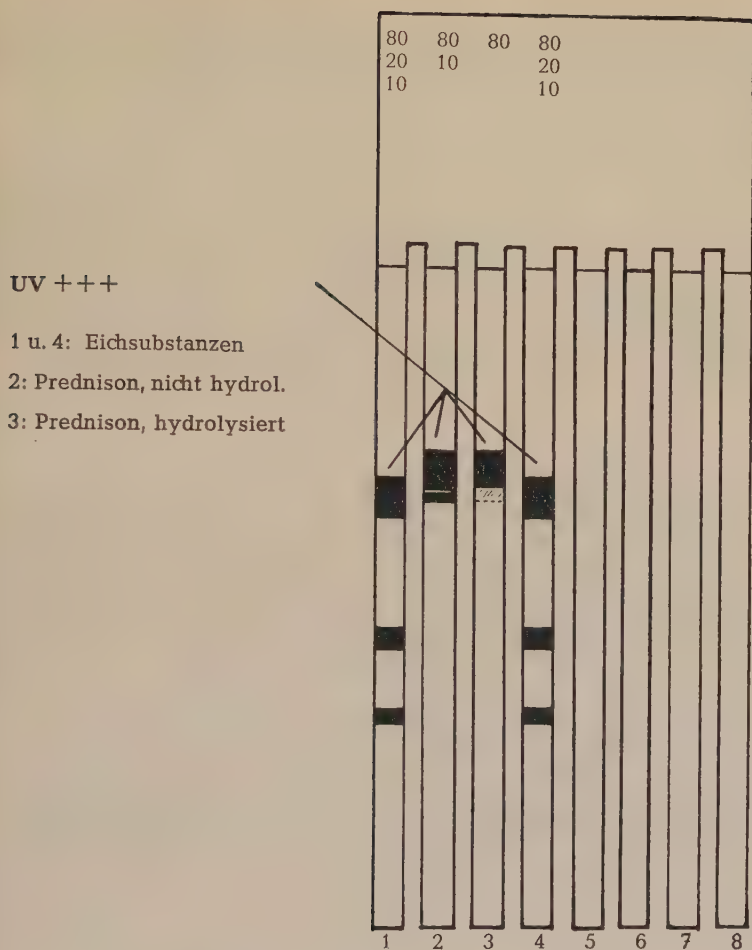
Die Wismutatoxydation verändert Prednison durch Abspaltung der Seitenkette zu 3-, 11-, 17-triketo-androst- Δ^1 - Δ^4 -dien. Bis auf die Δ^1 -Doppelbindung ist das Oxydationsprodukt des Prednisons theoretisch also mit Adrenosteron identisch. Bei der Kolorimetrie nach Oxydation wurden folgende Ergebnisse gefunden, ausgedrückt in DHA-Äquivalenten:

	Soll	Ist mit Hydrolyse			Ist ohne Hydrolyse		
Prednison, oxydiert mg/L	250,0	95,5	228,0	148,0	96,5	242,0	15
Modifikation		I	II	III	I	II	III
Ausbeute in %	100,0	38,2	91,3	59,2	38,6	96,8	62
Verhältnis		1 :	2,39 :	1,55	1 :	2,51 :	1,6

Tabelle 23

Bei der kolorimetrischen Erfassung des oxydierten Prednisons treten also deutliche Unterschiede zum Cortison auf, die sich in einer Erniedrigung der Werte in Modifikation II und ihrer Erhöhung in Modifikation III bemerkbar machen, während die der ersten Modifikation nur geringfügig absinken. Vor allem der sehr eindrucksvolle Anstieg der Modifikation III (hier rund 60% Ausbeute in DHA-Äquivalenten gegenüber 20% beim Cortison!) läßt an eine Veränderung in der qualitativen Zusammensetzung der Farbchromogene denken, da hier offenbar eine wesentlich bessere Chloroformlöslichkeit des Ketosteroid/DNB-Komplexes vorliegt. Somit läßt die Tatsache, daß Cortison und Prednison nach Oxydation verschieden erfassbar sind, eine Differenzierung dieser Substanzen im wässrigen Milieu zu. An den kolorimetrischen Ergebnissen des oxydierten Prednisons ist außerdem festzustellen, daß die nicht hydrolysierten Werte im Verhältnis gering höher liegen, als dies bei den beiden anderen Hormonen der Fall ist.

Die PCG zeigt ebenfalls ein vom oxydierten Cortison unterschiedliches Verhalten. Bei der Auftrennung des oxydierten Prednisons färbt sich eine Hauptfraktion mit einem mittleren Laufwert von 0,43 an, die also etwas langsamer als das Hauptprodukt des oxydierten Cortisons (0,49) und als Adrenosteron (0,51) läuft. Dies dürfte in erster Linie der Δ^1 -Doppelbindung zuzuschreiben sein. Als weitere, typische Fraktion stellt sich eine Substanz dar, deren Laufwert vollständig dem des Adrenosterons entspricht, was bedeutet, daß die Δ^1 -Doppelbindung verloren gegangen ist. Diese Fraktion macht etwa 5-8% der Gesamtfarbe aus, sie ist jedoch bei der hydrolysierten Probe deutlich reduziert und nur noch als Schleier anfärbbar, was die geringe Differenz bei der Kolorimetrie der hydrolysierten bzw. nicht hydrolysierten Proben in Modifikation II und III ausmacht. Erklärt werden könnte diese Tatsache mit



— Abb. 9 —

der Annahme einer relativen Empfindlichkeit des hier entstehenden Adrenosterons gegenüber den Hydrolysemanipulationen. Die beiden beschriebenen Fraktionen zeigen UV-Absorption bei $250\text{m}\mu$. Hinsichtlich der Extrahierbarkeit des oxydierten Prednisons ist zu sagen, daß die gute Übereinstimmung der Modifikation I mit den entsprechenden Werten beim oxydierten Cortison sowie die weitgehende, chemische Ähnlichkeit von Cortison und Prednison es wahrscheinlich machen, daß die Extrahierbarkeit des letzteren nach Oxydation der des oxydierten Cortisons ähnlich ist.

Die folgenden Tabellen 24, 25 und 26 enthalten, in DHA-Äquivalenten ausgedrückt, die Werte, die kolorimetrisch nach Zusatz von Prednison zum Urin gefunden wurden.

Urin 1

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	19,4	39,0	18,5	17,0	34,0	14,5
Verhältnis	1 :	2,01 :	0,95	1 :	2,00 :	0,88

Tabelle 24a

	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
Modifikat.	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Nach Prednison-Zus. mg/L	37,4	25,4	57,0	50,7	36,5	35,0	35,0	20,0	52,0	38,2	32,5	30,0
o/o Nachw. Prednison	33,3		65,0		97,2		16,7		23,4		89,0	
Verhältnis (Ist-Werte)	1 : 1		2,00 : 1		1,38 : 1		1 : 1		1,91 : 1		1,53 : 1	
	+ 18 mg/L Prednison						+ 18 mg/L Prednison					

Tabelle 24b

Urin 2

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	6,0	12,9	7,1	4,4	9,4	4,2
Verhältnis	1 :	2,15 :	1,18	1 :	2,14 :	1,05

Tabelle 25a

	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
Modifikat.	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Nach Prednison-Zusatz in mg/L	31,0	20,4	37,9	51,5	32,1	18,5	29,4	19,6	34,4	40,0	29,2	12,4
Nachw. Prednison	57,5		154,5		45,6		60,8		122,5		32,8	
(Verhältnis Werte)	1 :		2,52 :		0,91		1 :		2,04 :		0,63	
	+ 25 mg/L Prednison						+ 25 mg/L Prednison					

Tabelle 25b

Urin 3

	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
Modifikation	I	II	III	I	II	III
Nativwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	11,4	23,1	8,5	9,0	19,5	6,0
Verhältnis	1	: 2,01	: 0,74	1	: 2,17	: 0,66

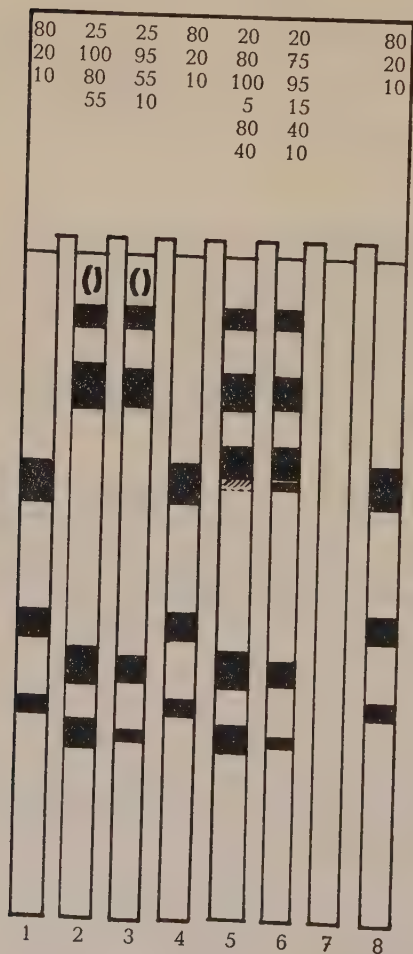
Tabelle 26a

	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
Modifikat.	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
Nach Prednison-Zusatz in mg/L	21,4	14,4	33,1	30,1	18,5	12,6	19,0	11,0	29,5	25,0	16,0	11,3
Nachw. Prednison	30,0		70,0		41,0		20,0		55,0		53,0	
Verhältnis (Werte)	1 : 1		2,09 : 1		0,88		1 : 1		2,28 : 1		1,03	
	+ 10 mg/L Prednison						+ 10 mg/L Prednison					

Tabelle 26b

Die Erörterung der vorstehenden, kolorimetrischen Ergebnisse nach Prednisonzusatz zum Urin kann sich mit dem Hinweis auf die analogen Versuche mit Cortison und Hydrocortison begnügen, denn, wie die Werte zeigen, ist

1, 4 u. 8: Eichsubstanzen
 2 u. 3: Nativurin 1, Ausgangsmenge 270 γ (Mod. I, hydrol.)
 5. u. 6: Nach Prednison-Zusatz, Ausgangsmenge 330 γ , (Mod. I, hydrol.)
 2 u. 5: hydrolysiert
 3 u. 6: nicht hydrolysiert



— Abb. 10 —

1, 4 u. 8: Eichsubstanzen
 2 u. 3: Nativurin 1, Ausgangsmenge 80 γ (Mod. I, hydrol.)
 5. u. 6: Nach Prednison-Zusatz, Ausgangsmenge 160 γ , (Mod. I, hydrol.)
 2 u. 5: hydrolysiert
 3 u. 6: nicht hydrolysiert



— Abb. 11 —

auch zugesetztes Prednison nur sehr unregelmäßig mit den kolorimetrischen Modifikationen im Urin nachweisbar. Abbildung 10 gibt das Bild der papierchromatographischen Auftrennung von Urin 1 nativ und nach Prednisonzusatz wieder, Abbildung 11 dasselbe von Urin 2.

Aus Abbildung 10 erkennt man, daß in diesem Urin das zugesetzte und oxydierte Prednison genau so nachgewiesen werden kann, wie in seiner wässrigen Lösung. Es scheint aber gleichzeitig wahrscheinlich, daß ein Teil des Hormons genau so verändert auftritt, wie oxydiertes Cortison, da bei der hydrolysierten Probe die vorletzte Urinfraktion (die in ihrem Laufwert der vorletzten Spurfraktion des oxydierten Cortisons in wässriger Lösung entspricht, s. oben) deutlich an Farbintensität zugenommen hat. Diese Vermutung fand eine nachhaltige Stütze in der Auftrennung des zweiten Urins (Abb. 11). Es färben sich nämlich bei Verarbeitung des nicht hydrolysierten Ansatzes die Hauptfraktion des oxydierten Prednisons sowie zwei weitere, neue Fraktionen an, die in ihrem Laufwert den ebenfalls im Urin teilweise deutlich hervortretenden Spurfraktionen des oxydierten Cortisons entsprechen. Gleichzeitig ist die Adrenosteronfraktion des oxydierten Prednisons verschwunden, und es ist nicht abwegig, anzunehmen, daß diese in dem vorliegenden Falle evtl. zusammen mit einem Teil der Hauptfraktion in die beiden neuen Fraktionen umgewandelt worden ist. Die hydrolysierte Probe läßt dagegen von den erwarteten Fraktionen des oxydierten Prednisons überraschenderweise keine mehr erkennen, dafür zeigen sich wiederum zwei gänzlich neue Substanzen, die mit den eben beschriebenen nicht identisch sind. Außerdem sieht man eine Zunahme der letzten Urinfraktion, ebenfalls offenbar durch den Prednisonzusatz hervorgerufen und als Hydrolysewirkung aufzufassen. Demnach läßt sich sagen, daß die Hydrolyse das zugesetzte Prednison in Abhängigkeit vom jeweiligen Urin mehr oder minder stark verändert, im zuletzt beschriebenen Fall sogar soweit, daß von der Ausgangssubstanz unmittelbar nichts mehr zu erkennen war. Es dürfte somit anzunehmen sein, daß mit den hier diskutierten Methoden eine zuverlässige und konstante Nachweisbarkeit des zugesetzten Prednisons nicht gelingt.

Die Vorbehandlung des Prednisons in wässriger Lösung mit NaBH_4 , wobei theoretisch das gleiche Produkt wie aus Cortison und Hydrocortison entstehen müßte, läßt in der Nivellierung der kolorimetrischen Werte den erwarteten Vorgang deutlich erkennen. Darüberhinaus stehen diese Werte in einer zahlenmäßig fast genauen Übereinstimmung mit den entsprechenden Werten des Cortisons. Damit drückt sich die große chemische Ähnlichkeit von Cortison und Prednison auch in der Hydrierbarkeit bzw. in der Zusammensetzung der Hydrierungsprodukte aus. Auch das Bild der PCG gleicht praktisch vollständig dem des mit NaBH_4 vorbehandelten und dann oxydierten Cortisons. (Abb. 12 u. Tab. 27). Die kolorimetrischen Ergebnisse, die nach Zusatz von Prednison zum Urin und NaBH_4 -Vorbehandlung gefunden wurden, bedürfen keiner näheren Erörterung, eine charakteristische Gesetzmäßigkeit

ist nach den entsprechenden Versuchen mit Cortison und Hydrocortison auch hier nicht zu erwarten. (s. Tabelle 28).



2 u. 3: 150 γ Ausgangsmenge Cortison, hydriert, (I, hydrol.)

5 u. 6: 150 γ Ausgangsmenge Prednison, hydriert, (I, hydrol.)

— Abb. 12 —

	Soll	Ist mit Hydrolyse			Ist ohne Hydrolyse		
Prednison n. Vorbeh. mit NaBH ₄ und Oxydation, mg/L	250,0	122,0	155,0	135,0	112,0	140,0	118,0
Modifikation		I	II	III	I	II	III
Ausbeute in % Prednison	100,0	48,8	62,0	54,0	44,8	56,0	47,1
Verhältnis		1 :	1,25 :	1,10	1 :	1,25 :	1,05

Tabelle 27

	mit Hydrolyse						ohne Hydrolyse					
Modifikat.	I		II		III		I		II		III	
	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist	Soll	Ist
h Prednison-Zus. L	18,3	13,4	32,0	24,2	20,3	15,6	14,0	10,8	26,0	21,9	14,5	9,0
Nachw. d. Prednison	45,5		13,4		47,8		54,4		15,5		35,8	
Verhältnis (Werte)	1 :		1,81 :		1,16		1 :		2,03 :		0,83	
	+ 9 mg/L Prednison						+ 7 mg/L Prednison					

Tabelle 28a

Modifikation	mit Hydrolyse			ohne Hydrolyse		
	I	II	III	I	II	III
aktivwerte des Urins in mg/L DHA-Äquivalente	9,3	23,0	11,3	7,0	19,0	7,5
Verhältnis	1 :	2,47 :	1,23	1 :	2,71 :	1,07

Tabelle 28b

— — —

Im folgenden soll noch kurz über Versuche berichtet werden, mit denen eine papierchromatographische Darstellung therapeutisch verabreichter Hormone (in diesem Fall Cortison, Hydrocortison und Prednison) erreicht werden sollte, die als Stoffwechselmetaboliten aus dem Urin mit Hilfe der 17KGS-Methode extrahiert wurden. Die Tatsache, daß die hier besprochenen Hormone in der Tetrahydroform vom Organismus ausgeschieden werden, ließ bei dem von uns benutzten PCG-System ein Vorherrschen langsam laufender Fraktionen erwarten.

Die Untersuchungsmöglichkeiten für Cortison und Prednison waren durch einen klinisch besonders gelagerten Fall sehr begünstigt. Bei einer Patientin, der wegen eines Cushing-Syndroms mit Nebennierenrindenhyperplasie 9/10 des Organs exstirpiert worden waren, konnten bei einer zu vernachlässigenden Sekretion des verbleibenden Restes der NNR die zur Substitution verabreichten Hormone nach Extraktion als Metaboliten papierchromatographisch rein dargestellt werden.

Dabei konnten bei Cortison und Prednison konstant gleichartige Fraktionsbilder gefunden werden und zwar in der Hauptsache jeweils zwei Fraktionen:

- a) eine Fraktion mit dem Laufwert von
0,09 — 0,11
- b) eine Fraktion mit dem Laufwert von
0,26 — 0,30

Diese beiden Fraktionen dürften nach Untersuchungen an der Klinik wahrscheinlich 11-keto-Aetiocholanolon und 11-hydroxy-Aetiocholanolon entsprechen. Nach vorherigem Versetzen des Urins mit NaBH_4 wurden hier keine neuen Fraktionen gefunden. Es zeigte sich aber, daß die am kürzesten laufende Fraktion auf Kosten der nächsten an Farbintensität zunimmt. Daraus lassen sich zwei Folgerungen als sehr wahrscheinlich ableiten:

- 1) Diese Änderung in den Mengenverhältnissen der Spaltprodukte ist sicherlich mit der Umwandlung des 11-Ketoaetiochanolons zur 11-hydroxy-Form zu erklären.
- 2) Die Tatsache, daß bei der papierchromatographischen Auftrennung keine Spaltprodukte vorhanden sind, die durch eine Reduktion mit NaBH_4 zum Verschwinden gebracht werden können, — vergl. das Verhalten von Cortison und Hydrocortison in wässriger Lösung vor und nach der Behandlung mit NaBH_4 — beweist, daß die Hormone nach therapeutischer Verabreichung bereits vom Organismus weitgehend hydriert worden sind. Dies deckt sich gut mit den Angaben der Literatur, nach denen die hier untersuchten Hormone in der Tetrahydroform ausgeschieden werden und nicht etwa in der Nativform. Dann nämlich müßten sich z. B. Adrenosteron oder andere, für Cortison bzw. für Prednison bezeichnende Oxydationsprodukte aus dem Harn extrahieren lassen.

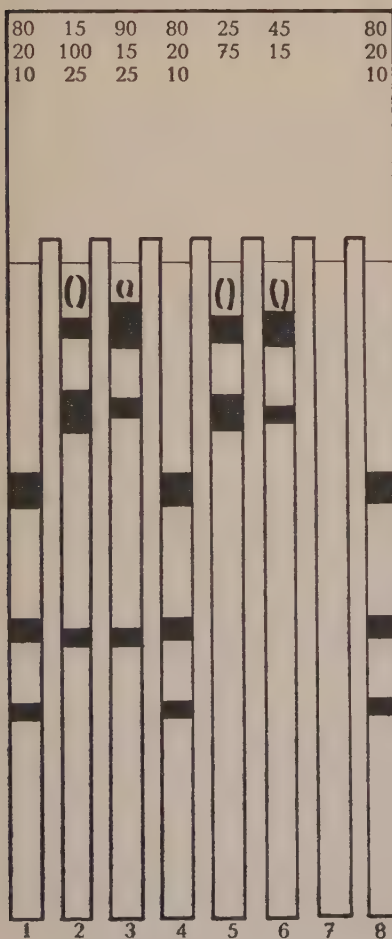
Ein weiterer Patient wurde mit Hydrocortison behandelt. Der Laufgeschwindigkeit nach wurden hier ebenfalls 11-keto- bzw. 11-hydroxy-Aetiocholanolon als den gefundenen Fraktionen zu Grunde liegende Substanzen angenommen. Ein Beweis für die intermediäre Hydrierung des Hydrocortisons kann mit der UV-Photographie erbracht werden; die Doppelbindung im Anschluß an C 3 im Hydrocortisonmolekül, die bei direkter Oxydation erhalten bleibt und sich in einer UV-Absorption bemerkbar macht, geht intermediär verloren. (Die UV-Photographie wurde z. Zt. des zuletzt beschriebenen Versuches noch nicht durchgeführt, somit konnte obiger Beweis praktisch nicht erfolgen).

Die folgenden Abbildungen geben ein Beispiel für das papierchromatographische Bild eines Urins nach therapeutischer Verabreichung von Cortison, Hydrocortison und Prednison.

— Abb. 13 —

Streifen 2/3: Urinfraktionen vor der Operation (s. o.), 150 γ Ausgangsmenge, ohne Hydrolyse, ohne u. nach NaBH₄-Zugabe.

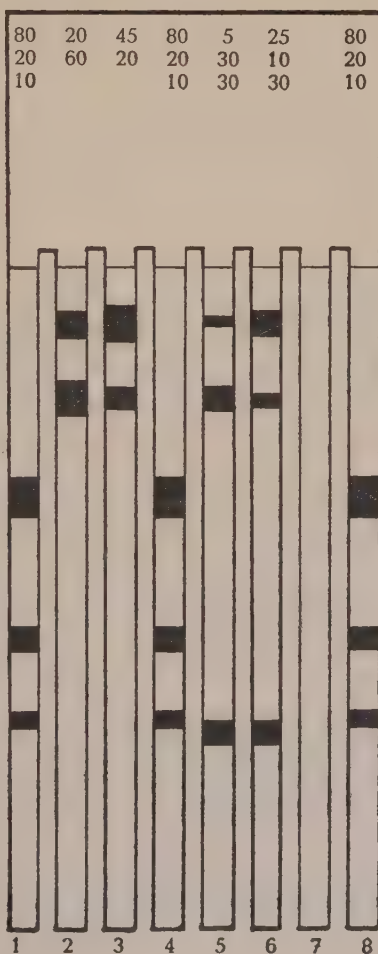
Streifen 5/6: Urinfraktionen nach Operation, nach Verabreichung von Cortison, ohne Hydrolyse, ohne und nach NaBH₄-Zugabe. (100 γ ohne, 70 γ nach NaBH₄)



— Abb. 14 —

Streifen 2/3: Nach Verabreichung von Prednison, 14 Tg. nach der Operation, ohne Hydrolyse, Ausgangsmenge 100 γ ohne, 80 γ nach NaBH₄-Zugabe

Streifen 5/6: Nach Verabreichung von Hydrocortison bei einem anderen Patienten. (70 γ)



ZUSAMMENFASSENDE BESPRECHUNG

Mit dieser Arbeit sollte geklärt werden, wieweit die von NORYMBERSKI und anderen Autoren zum Beweis der Methode der 17-ketogenen Steroidbestimmung verwendeten Substanzen Cortison und Hydrocortison als Eichsubstanzen brauchbar sind. Diese Steroide kommen im nativen Harn höchstens in sehr unbedeutenden Mengen vor, da sie in der Regel vom Organismus ab- bzw. umgebaut als Tetrahydroverbindungen ausgeschieden werden. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich bei der Bestimmung von Cortison und Hydrocortison als KGS verschiedene Modifikationen der Zimmermann'schen Farbreaktion unterscheiden. Zur Lösung dieser Fragen sollte u.a. besonders die Papierchromatographie herangezogen werden. Das synthetische Steroid Prednison wurde in die Untersuchungen mit einbezogen, — da es therapeutisch besonders umfangreiche Verwendung findet, — um den Einfluß der Δ^1 -Doppelbindung im Gegensatz zum Cortison wenigstens teilweise studieren zu können. Die kolorimetrischen Ergebnisse, die bei der KGS-Bestimmung der wässrigen Lösungen der diskutierten Hormone gefunden wurden, seien hier noch einmal gegenübergestellt: (Ausbeute in %/DHA-Äquivalente).

Substanz	Cortison			Hydrocortison			Prednison		
Modifikation	I	II	III	I	II	III	I	II	III
mit Hydrolyse	43,6	126,0	20,0	42,8	27,0	16,0	38,2	91,3	59,0
ohne Hydrolyse	44,0	127,2	20,8	43,2	27,2	16,2	38,6	96,8	62,0
Verhältnis (m. H.)	1 :	2,88 :	0,46	1 :	0,63 :	0,27	1 :	2,39 :	1,00
Verhältnis (o. H.)	1 :	2,86 :	0,47	1 :	0,63 :	0,27	1 :	2,51 :	1,00

Die Ergebnisse der Untersuchungen können in folgenden Punkten zusammengefaßt werden:

I)

Die Oxydation mit NaBiO₃ im Überschuß bedingt oftmals die Entstehung von Produkten, die nach theoretischen Überlegungen nicht erwartet werden. Dies gilt vor allem in dem Sinne, daß außer dem theoretisch vorauszusagenden Oxydationsprodukt noch andere zusätzlich entstehen.

II)

Die Kochhydrolyse mit konzentrierter Salzsäure läßt in der Regel diese Veränderungen deutlicher werden. Diese Beobachtung bezieht sich in der Haupt-

sache auf Urinextrakte, sie konnte bei den wässrigen Hormonlösungen nicht bestätigt werden.

III)

Die Zimmermann'sche Farbreaktion zeigt in den drei Modifikationen größere Unterschiede, als das bei der 17KS-Bestimmung bekannt ist. Das Verhältnis der Modifikationen zueinander kann bisweilen Aufschluß über die qualitative Zusammensetzung des Steroidgemisches geben.

IV)

Bei Modifikation I nach Callow sind die Unterschiede der Farbäquivalente der einzelnen Steroide noch am geringsten, stärkere Schwankungen treten bei Verwendung der Modifikationen II und III auf.

V)

Die Wahl des Extraktionsmittels ist für die Ausbeute von bedeutendem Einfluß. Um Vergleichsmöglichkeiten in umfangreicherem Maße zu bekommen, ist es wichtig, sich auf ein Extraktionsmittel festzulegen, wie es in der hiesigen Klinik mit der Wahl des Äthers geschehen ist.

VI)

Die Papierchromatographie ist zur Erklärung der kolorimetrischen Ergebnisse sehr aufschlußreich, insbesondere dadurch, daß mit ihrer Hilfe auftretende Spaltprodukte identifiziert werden können. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Menge und des entsprechenden Farbäquivalentes lassen sich die kolorimetrischen Ergebnisse interpretieren.

VII)

Für die zielgerichtete Durchführung und die exaktere Auswertung der 17KGS-Methode sind auf Grund meiner Untersuchungen folgende Voraussetzungen anzustreben:

1. Es muß Klarheit darüber herrschen, welche Oxydationsprodukte in Wirklichkeit, d. h. unter den gegebenen Versuchsbedingungen aus C-21-Steroiden bei ihrer Umwandlung in 17-Ketosteroide entstehen und welcher prozentuale Anteil den jeweiligen Spaltprodukten innerhalb eines Gemisches zukommt.

2. Es muß bekannt sein, welche Veränderungen eines zugesetzten Hormons im Urinmilieu möglich sind. Einige Beispiele solcher Veränderungen sind in dieser Arbeit dargestellt worden. Insbesondere hatten aber Versuche an der Klinik erwiesen, daß eine Ursache für die sehr uneinheitliche Nachweisbarkeit des zugesetzten Hormons die jeweilige Urinzusammensetzung ist. Somit liegt die Empfehlung nahe, den Gehalt des Urins an Mineralien z. B. zu kontrollieren bzw. zu standardisieren, um auf diese Weise für die

KGS-Bestimmung eine möglichst einheitliche Ausgangsbasis zu schaffen.

3. Die Farbäquivalente der einzelnen Oxydationsprodukte für die drei Modifikationen der Zimmermann'schen Reaktion müssen bekannt sein.

4. Die Extrahierbarkeit der entstehenden 17-KS mit dem verwendeten Lösungsmittel in dem jeweils vorhandenen Milieu muß ebenfalls bekannt sein.

VIII)

Die Brauchbarkeit einer Substanz zu Eichzwecken wird also umso größer sein, je geringer die Zahl der Oxydationsprodukte ist, die aus ihr entstehen, und je unabhängiger von Urinzusatz diese nachzuweisen sind. Ebenso muß die Extrahierbarkeit einer solchen Eichsubstanz gleichmäßig sein.

Die hier bearbeiteten Hormone zeigen diese Eigenschaften nur in einem sehr begrenzten Maße und eignen sich daher für Eichzwecke wenig.

IX)

Die unter Abschnitt VII genannten Punkte müssen besonders für die tatsächlich im Urin auftretenden Metaboliten, z. B. Tetrahydrocortison, Tetrahydrocortison, Pregnantriol etc. herausgearbeitet werden.

Am Schluß der Arbeit wird noch kurz auf Versuche eingegangen, die sich mit dem Nachweis therapeutisch verabreichter Hormone befassen. Dieser gelang mit Hilfe der Papierchromatographie recht eindeutig im Sinne der erwarteten, intermediären Stoffwechselmetaboliten.

.—.—.

Herrn Professor Dr. A. W i s k o t t bin ich für die freundliche Genehmigung zur Durchführung der Untersuchungen im Labor der Universitäts-Kinderklinik zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. W. F r e i s l e d e r e r möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine verständnisvolle Anleitung und die wertvollen Hinweise herzlich danken.

Literaturverzeichnis

- 1) Abderhalden, R. : „Die Hormone“, Springer-Verlag, 1952
- 2) Appleby, J.I., Gibson, G., Norymberski, J.K., & Stubbs, R.D. : biochem.J.57,XIV, (1954)
- 3) Appleby, J.I., Gibson, G., Norymberski, J.K., & Stubbs, R.D. : biochem.J.60,453ff, (1955)
- 4) Appleby, J.I. u. Norymberski, J.K. : biochem.J.60,460 (1955)
- 5) Brooks, C.J.W. and Norymberski, J.K. : biochem.J.55,371ff (1953)
- 6) Burton, R.B., Zaffaroni, A., Keutman, E.H. : J.biol.chem.188,763 (1951)
- 7) Burton, R.B., Zaffaroni, A., Keutman, E.H. : J.biol.chem.193,769, (1951)
- 8) Bush, I.E. : J.endocrin.7,Lxxxiii, (1951)
- 9) Bush, I.E., de Courcy, C., Gray, C.H. : J.endocrin.8,xii, (1952)
- 10) Bush, I.E. : biochem.J.50,370ff, (1952)
- 11) Callow, N.H., Callow, R.K., and Emmes, C.W. : biochem.J.32,1312, (1938)
- 12) Diczfalussy, E., Birke, G., Plantin, L.-O., Westman, A. : acta endocrin.18,356ff (1955)
- 13) Diczfalussy, E., Birke, G., Plantin, L.-O. : Klin.Wo.,34. Jahrg., Heft 9/10, p.225ff (1956)
- 14) Heidt, L.J., Gladding, E.K., Purves, C.B. : Paper Tr.J.,121,No. 9,35 (1945)
- 15) Neher, R., v. Arx, G. : Helv.chim.acta,Vol. XXXIX Fasc.VI,Nr.199,p.1664 (1956)
- 16) Norymberski, J.K. : Nature (Lond.), 170,1074, (1952)
- 17) Norymberski, J.K., Stubbs, R.D., West, H.F. : Lancet, 1276ff. (1953)
- 18) Physiol. Chemie II : Der Stoffwechsel, 1. Teil, Springer-Verlag, (1954)
- 19) Reichstein, T. : Helv.chim.acta 20,978 (1937)
- 20) Rigby, W. : Nature (Lond.), 164,185
- 21) Schild, W. : Klin.Wo., 32, 13/14, (1954)
- 22) Talbot, N.B., Berman, R.A., McLachlan, E.A. : J.biol.chem.,143,211, (1942)
- 23) Talbot, N.B., Salzmann, A. u. Mitarb. : J.biol.chem.,160,535, (1945)
- 24) Weissbecker, L. : Klinik der NN-Insuffizienz und ihre Grundbegriffe, (1954)
- 25) Zimmermann, W. : Hoppe-Seyler 233, 257, (1935)
- 26) Zimmermann, W. : Hoppe-Seyler 245, 47, (1936)
- 27) Zimmermann, W., Anton, H.U., Pontius, D. : Hoppe-Seyler 289, 91, (1952)

Lebenslauf

Als erster Sohn des Fabrikanten Edgar St o l e c k e und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Stöhr, wurde ich am 31. Juli 1932 in Wuppertal geboren. Nach unbeschwerten Kinderjahren kam ich 1938 in die Volksschule Yorkstraße in Wuppertal-Vohwinkel. Nach den vier Grundschuljahren besuchte ich zunächst das naturwissenschaftliche Gymnasium in Wuppertal-Vohwinkel, später das altsprachlich-humanistische Gymnasium in Wuppertal-Elberfeld. Dort bestand ich 1953 die Reifeprüfung. Anschließend begann ich mit dem Studium der Medizin, zunächst in Marburg an der Lahn, wo ich 1955 die ärztliche Vorprüfung ablegte. Vom 2. klinischen Semester an studierte ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Mit dem Sommersemester 1958 beendete ich dort das Studium und meldete mich zur ärztlichen Prüfung, die ich am 9. 12. 1958 erfolgreich abschloß. Am 18. 12. 1958 promovierte ich unter Vorlage dieser Arbeit.

München, 31. 12. 1958

